

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**“Caracterización y control de cepas de *Leuconostoc*  
deterioradoras de jarabe de leche y base de helados”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en  
Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

QFB. Cinthya Lizbeth Bravo Pantaleón

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Centro Universitario. Querétaro, Qro. Diciembre 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Caracterización y control de cepas de *Leuconostoc*  
deterioradoras de jarabe de leche y base de helados

**por**

Cinthy Lizbeth Bravo Pantaleón

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** FQMAC-309116



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

**Caracterización y control de cepas de *Leuconostoc*  
deterioradoras de jarabe de leche y base de helados**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presenta

**QFB. Cinthya Lizbeth Bravo Pantaleón**

Dirigido por

**Dra. Sofía María Arvizu Medrano**

**SINODALES**

Dra. Sofía María Arvizu Medrano  
**Presidenta**

\_\_\_\_\_  
**Firma**

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga  
**Secretario**

\_\_\_\_\_  
**Firma**

Dr. Aldo Amaro Reyes  
**Vocal**

\_\_\_\_\_  
**Firma**

Dra. Angélica Godínez Oviedo  
**Suplente**

\_\_\_\_\_  
**Firma**

Dra. Roció Crystabel López González  
**Suplente**

\_\_\_\_\_  
**Firma**

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
**Director de la facultad**

\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña  
**Director de investigación y  
posgrado**

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Diciembre de 2023

## DEDICATORIA

*A mis padres, por el apoyo incondicional brindado en todos y cada uno de mis proyectos.*

*A mis hermanos, por siempre estar ahí a pesar de la distancia.*

*A Francisco Silvestre, por estar conmigo a lo largo de este proyecto, alentándome en todo momento.*

*Al Dr. Fausto Tejeda Trujillo<sup>†</sup>, por motivarme hasta el último momento para alcanzar mis metas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, la Dra. Sofía María Arvizu Medrano por su mentoría a lo largo de todo el proyecto, no solo en la parte académica, sino también en lo personal. Gracias por su paciencia y dedicación.

A mis sinodales, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, Dr. Aldo Amaro Reyes, Dra. Angélica Godínez Oviedo, Dra. Roció Crystabel López González por todas y cada una de sus valiosas aportaciones al proyecto.

A la Dra. Dalia Miranda Castilleja por su total apoyo en la realización del proyecto, por todos los consejos brindados.

A mis compañeros que con el paso del tiempo formamos un vínculo de amistad más allá de la academia, gracias por todos los momentos compartidos.

Al Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA) por su apoyo para realizar parte del proyecto en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

A todas y cada una de las personas dentro y fuera de la academia que aportaron un granito de arena para hacer posible la culminación del proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1 Productos lácteos.....	3
II.1.1 Producción e importancia económica.....	3
II.1.2 Productos lácteos azucarados: base para helados y jarabe de leche.....	4
II.2 Pérdida de alimentos.....	6
II.3 Deterioro de los alimentos.....	9
II.3.2 Deterioro bacteriano en productos lácteos.....	12
II.4 Bacterias ácido lácticas.....	14
II.5 Género <i>Leuconostoc</i> .....	15
II.5.1 Identificación y caracterización.....	17
II.6 Control de bacterias ácido lácticas en la producción de alimentos.....	18
II.6.1 Tratamientos físicos.....	19
II.6.2 Tratamientos químicos.....	19
III. OBJETIVOS.....	21
III.1 Objetivo general.....	21
III.2 Objetivos particulares.....	21

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
IV.1 Materiales.....	22
IV.1.1 Equipos e instrumentos.....	22
IV.1.2 Medios de cultivo.....	23
IV.1.3 Reactivos.....	23
IV.1.4 Material para pruebas de deterioro y termo tolerancia.....	23
IV.2 Métodos.....	24
IV.2.1 Estrategia experimental general.....	24
IV.2.2 Recolección de muestras de productos lácteos azucarados .....	24
IV.2.2.1 Aislamiento de <i>Leuconostoc</i> spp. ....	25
IV.2.2.2 Identificación fenotípica de <i>Leuconostoc</i> spp. ....	25
IV.2.2.3 Proceso de activación y lavado de cepas .....	25
IV.2.3 Identificación de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. a nivel género .....	26
IV.2.3.1 Extracción de ADN.....	26
IV.2.3.2 Identificación de cepas no <i>Leuconostoc</i> spp. ....	26
IV.2.4 Evaluación de la capacidad de deterioro de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. .....	28
IV.2.5 Caracterización genotípica mediante Amplificación Polimórfica Aleatorizada de ADN (RAPD).....	29
IV.2.6 Evaluación a conservadores y resistencia a calor de cepas <i>Leuconostoc</i> spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado.....	30
IV.2.6.1 Evaluación a conservadores .....	30
IV.2.6.2 Evaluación de resistencia a calor.....	31
IV.2.7 Análisis estadístico .....	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
V.1 Aislamiento e identificación de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado .....	32
V.2 Evaluación de la capacidad de deterioro de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. ....	36

V.3 Caracterización genotípica mediante Amplificación Polimórfica Aleatorizada de ADN (RAPD) .....	43
V.4 Evaluación de conservadores frente a cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado.....	46
V.5 Resistencia térmica de cepas <i>Leuconostoc</i> spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado. ....	51
VI. CONCLUSIONES .....	58
VII. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS.....	59
VIII.REFERENCIAS .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pérdida de alimentos desde la etapa posterior a la cosecha hasta la distribución en 2016, porcentajes por grupos de productos.....	7
<b>Figura 2.</b> Estrategia experimental general.....	24
<b>Figura 3. a)</b> Instalación copa Ford para medir viscosidad <b>b)</b> Medición de viscosidad al eludir jarabe de leche a través de la copa.....	29
<b>Figura 4.</b> Morfología típica de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp.: a) colonial, b) microscópica.....	32
<b>Figura 5.</b> Valores de pH alcanzados en jarabe de leche inoculado con cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. por 14 días a 10 °C. □ pH <5, □ pH 5-6, □ pH >6. Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■). .....	40
<b>Figura 6.</b> Viscosidad de jarabe de leche inoculado con cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. por 14 días a 10 °C. □ viscosidad alta, □ viscosidad intermedia, □ viscosidad baja. Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■). .....	41
<b>Figura 7.</b> Caracterización de la capacidad de deterioro de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. en jarabe de leche. ....	42
<b>Figura 8.</b> Clústeres formados por cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. con base en el perfil de RADP. Cepas con mayor capacidad de deterioro ( ). Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■). .....	45
<b>Figura 9.</b> Incremento de la DO de las cepas en MRS conteniendo conservadores: <b>A)</b> nisina y <b>B)</b> Lactiplus, en contraste con el control sin conservador. ....	47
<b>Figura 10.</b> Histograma de valor D <sub>57</sub> de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. ....	54
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. termotolerantes (57 °C). ...	55
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de capacidad de deterioro de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. con respecto a su termotolerancia. ....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Iniciadores específicos para <i>Leuconostoc</i> y principales géneros de BAL. .....	27
<b>Tabla 2.</b> Iniciador aleatorio y condiciones de amplificación para <i>Leuconostoc</i> spp. .....	30
<b>Tabla 3.</b> Muestras analizadas y cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. recuperadas en base a características fenotípicas. ....	32
<b>Tabla 4.</b> Identificación genética de cepas aisladas de jarabe de leche y base para helado.....	34
<b>Tabla 5.</b> Valor $D_{57}$ de <i>Leuconostoc</i> spp. en jarabe de leche.....	53

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

---

Q.F.B Cinthya Lizbeth Bravo Pantaleón

## RESUMEN

El jarabe de leche y la base para helado son productos lácteos azucarados empleados como materias primas en las industrias repostería, panadera y del helado. Debido a su contenido de nutrientes y pH ( $\sim 7$ ) son susceptibles al deterioro bacteriano. *Leuconostoc* se ha señalado como microorganismo causante de deterioro al producir cambios en olor, viscosidad y disminución de pH en los alimentos, provocando la pérdida de estos. Por tal motivo el presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Leuconostoc* deterioradoras de jarabe de leche y base para helado, así como evaluar estrategias para su control. En este estudio se analizó un total de 93 muestras de jarabe de leche (n=52) y base para helado (n=41) deterioradas y no deterioradas, para aislar e identificar fenotípica y genotípicamente cepas de *Leuconostoc*. Se evaluó la capacidad de deterioro de las cepas en jarabe de leche y se midieron cambios en la población bacteriana, pH y viscosidad. Además, se investigó la diversidad genética utilizando la técnica de RAPD, así como la resistencia a conservadores (Lactiplus 0.5 % y nisina 6 ppm) y calor (52 °C). Se recuperaron un total de 48 cepas, de las cuales el 95.8 % (46/48) se identificaron como *Leuconostoc* spp., la capacidad de deterioro de las cepas se evidenció por un pH ácido (5.0) y una viscosidad elevada (>175 centistokes), manifestada por el 67.4 % de las cepas (31/46). Se encontró una alta diversidad genética, reflejada por 18 perfiles genéticos identificados. La mayoría de las cepas de *Leuconostoc* spp. mostraron susceptibilidad a Lactiplus (97.8 %) y tolerancia generalizada a nisina (100 %). La aplicación de 52 °C por 15 min generaron una reducción promedio de  $1.71 \pm 0.83$  Log UFC/mL. La mayoría de las cepas deterioradoras de jarabe de leche y base para helado pertenecen al género *Leuconostoc* y presentan una elevada diversidad genética. El uso de Lactiplus, así como la temperatura permite el control de su crecimiento y como consecuencia minimiza el deterioro y las pérdidas económicas asociadas a los productos.

**Palabras clave:** Jarabe de leche, base para helado, *Leuconostoc*, deterioro microbiano.

## ABSTRACT

Milk syrup and ice cream base are sweetened milk products used as raw materials in the confectionery, bakery and ice cream industries. Due to their nutrient content and pH ( $\sim 7$ ) they are susceptible to bacterial spoilage. *Leuconostoc* has been identified as a spoilage-causing microorganism by producing changes in odor, viscosity and pH decrease in foods, causing food loss. Therefore, the objective of this study was to isolate and characterize *Leuconostoc* spoilage strains of milk syrup and ice cream base, as well as to evaluate strategies for their control. In this study, a total of 93 spoilage and non-spoilage samples of milk syrup (n=52) and ice cream base (n=41) were analyzed to isolate and identify phenotypically and genotypically *Leuconostoc* strains. The spoilage capacity of the strains in milk syrup was evaluated and changes in bacterial population, pH and viscosity were measured. In addition, genetic diversity was investigated using the RAPD technique, as well as resistance to preservatives (Lactiplus 0.5 % and nisin 6 ppm) and heat (52 °C). A total of 48 strains were recovered, of which 95.8 % (46/48) were identified as *Leuconostoc* spp. The spoilage capacity of the strains was evidenced by an acidic pH (5.0) and high viscosity ( $>175$  centistokes), manifested by 67.4 % of the strains (31/46). High genetic diversity was found, reflected by 18 identified genetic profiles. Most of the *Leuconostoc* spp. strains showed susceptibility to Lactiplus (97.8 %) and generalized tolerance to nisin (100 %). The application of 52 °C for 15 min generated an average reduction of  $1.71 \pm 0.83$  Log CFU/mL. Most of the spoilage strains of milk syrup and ice cream base belong to the *Leuconostoc* genus and present a high genetic diversity. The use of Lactiplus, as well as the temperature, allows the control of their growth and as a consequence minimizes spoilage and economic losses associated with the products.

**Key words:** Milk syrup, ice cream base, *Leuconostoc* spp., microbial spoilage.

## I. INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es uno de los grandes desafíos que se enfrenta hoy en día en el mundo, debido a la creciente población y a la pérdida de alimentos en su cadena de suministros. Según la FAO, se desperdicia un tercio de los alimentos que se producen, es decir, 1, 300 millones de toneladas anuales, siendo el deterioro una de las causas de esta pérdida; aproximadamente el 14 % de estos alimentos se encuentran en proceso de deterioro antes de llegar a su destino final, causando pérdidas económicas a lo largo de la cadena (FAO, 2019). Los microorganismos son los principales agentes que causan el deterioro de los alimentos. Este fenómeno puede deberse a distintos factores como materias primas de baja calidad, condiciones de procesamiento inefectivas, transporte y almacenamiento del producto inadecuado, así como deficiente manejo higiénico por parte del personal que los elabora. La detección de los microorganismos deterioradores no suele realizarse de manera rutinaria ya que generalmente no se incluyen en normas que se aplican a los alimentos.

El deterioro puede presentarse en cualquier tipo de productos, pero hay una mayor afinidad por productos mínimamente procesados (frutas, verduras, etc.) y aquellos con alto contenido de nutrientes (carne, leche, etc.), por ser ambientes idóneos para que los microorganismos puedan desarrollar.

Los productos lácteos azucarados son alimentos que son altamente susceptibles al desarrollo microbiano, principalmente por su contenido de nutrientes, al favorable nivel de actividad de agua y en la mayoría de ellos a su pH cercano a la neutralidad. Dentro de los productos lácteos azucarados encontramos al jarabe de leche y base para helado que son empleados principalmente como materias primas e insumos para grandes industrias como la repostería, panadera o del helado. *Leuconostoc* es una bacteria ácido láctica (BAL) que se ha asociado al deterioro de productos como vegetales o cárnicos, causando en ellos alteraciones no deseables, como mal olor, aumento de viscosidad, acidificación y gasificación. Se cree que estas alteraciones también las puede reproducir en otras matrices como

los productos lácteos, al ser estos muy favorables para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos.

Por tal motivo se vuelve relevante el control del deterioro de productos lácteos azucarados, así como la caracterización de las bacterias que lo causan para generar medidas eficientes para su prevención, alargando con ello la vida útil del alimento y la reducción del desperdicio. El proyecto surge por el interés de una empresa de la región del bajío que ha tenido problemas de deterioro en productos como jarabe de leche y base para helados. Por ello el objetivo del presente trabajo fue caracterizar cepas de *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado y evaluar su tolerancia a factores que puedan ser usados como estrategias para su control, redundando en un beneficio para la empresa y la región en donde se encuentra.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Productos lácteos

Los productos lácteos juegan un papel importante en la dieta de las personas, principalmente en los niños y adolescentes (Dougkas *et al.*, 2019). La leche es uno de los alimentos naturales más antiguos y un componente básico en la alimentación humana. La leche es un alimento completo para la nutrición humana, contiene todos los componentes básicos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la vida (Spreer & Mixa, 2017).

Se ha demostrado que la leche y sus derivados desempeñan un papel importante como vehículos de nutrientes esenciales para el adecuado funcionamiento del organismo, al ser fuente esencial de proteínas, grasas, minerales (Ca) y vitaminas (riboflavina, B 12), así como de poliaminas y nucleótidos, entre otros micronutrientes (Huertas *et al.*, 2019).

Con base a la NOM-183-SCFI-2012, un producto lácteo es *“aquel elaborado a partir de ingredientes propios de la leche, tales como caseína, grasa, suero de leche, agua para uso y consumo humano, con un mínimo de 22 g/L de proteína de la leche y, de ésta, el 80 % de caseína y puede contener grasas de origen vegetal”*. El valor nutricional y la calidad de los productos lácteos y la leche dependen de diversos factores como: la raza animal, la salud y la dieta del animal, la ubicación geográfica del pastoreo y el manejo de los animales (Dougkas *et al.*, 2019).

#### II.1.1 Producción e importancia económica

Los productos lácteos al tener un papel importante como alimento básico a nivel mundial, contribuyen de manera activa en la economía de los diferentes países productores, incluido México (FAO, 2020). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) en 2022, la producción mundial de leche fue de 937.3 millones de toneladas. De los cuales 20.1 millones de toneladas los produjo América Central y el Caribe, aumentando

2.1 % con respecto a 2021. México fue responsable de este aumento, debido a que la producción de leche aumentó 2.0 %. No obstante, en 2022 el mercado mundial de productos lácteos se redujo un 4.4 %, debido principalmente en una caída en las importaciones de diferentes países incluido México (FAO, 2023a).

En México, la leche de bovino es el producto lácteo de mayor producción en el sector pecuario, en 2022 hubo una producción de 13.1 millones de toneladas, mientras que en 2021 fue de 12.9 millones de toneladas, siendo Jalisco, Coahuila, Durango, Chihuahua y Guanajuato los principales estados productores. Con estas cifras México ocupa el lugar 15° como productor mundial (SIAP, 2021, 2023).

La industria de productos lácteos dentro del ramo de la industria alimentaria es una de las principales actividades de mayor importancia en México, ocupando el segundo lugar dentro del sector ganadero, con 22.8 % del valor de la producción (Espinoza-Arellano *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Gaona-Pineda *et al.* (2018), se encontró que el 73.8 % de la población estudiada en edad preescolar consumían productos lácteos, mientras que los de edad escolar, adolescentes y adultos se encontraron entre el 61.6 % - 66.6 %. Además, para estudiar las tendencias de consumo se comparó la ingesta cotidiana de productos lácteos por área (urbana, rural), región (Norte, Centro, CDMX, Sur) y nivel socioeconómico (bajo, mediano, bajo), donde los porcentajes de consumo fueron entre 69.4 y 82.0, concluyendo que, a pesar del área, región o nivel socioeconómico, los porcentajes de consumo son muy elevados. Debido a la alta demanda de los consumidores, la industria láctea adquiere un papel importante en la economía de México.

## II.1.2 Productos lácteos azucarados: base para helados y jarabe de leche

Los productos lácteos son universales en la sociedad moderna, debido a su simple formulación, elevado valor nutricional, atributos terapéuticos y modulación de diversas funciones fisiológicas (Early, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Dentro de los productos lácteos, los azucarados son un segmento importante como derivados

lácteos. Estos productos tienen gran importancia económica, ya que debido a su composición se emplean como materia prima para la elaboración de una gran variedad de productos, destacando a la industria del helado, repostería y pastelería como importantes consumidores de dichos productos. Según el Banco de Información Económica (BIE) del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2021, la elaboración de productos lácteos azucarados tuvo una producción bruta de 34.961 millones de pesos, aproximadamente un 22.2 % del total de producción de productos lácteos, la cual fue de 157.655 millones de pesos (INEGI, 2021; Vélez-Ruiz, 2018).

Productos lácteos azucarados como la base para helado y el jarabe de leche, son materias primas importantes para grandes industrias. La base para helado, la cual se define como una emulsión cuya composición se ajusta al helado (*“alimento producido mediante la congelación de una mezcla pasteurizada compuesta por una combinación de ingredientes lácteos”*), y cuya presentación puede ser en forma líquida, concentrada o en polvo, es materia prima fundamental para la industria del helado. En México el mercado de esta industria alcanzó un valor de 2.20 mil millones de dólares en 2022, mientras que en Estados Unidos tuvo un impacto en su economía de 13.10 mil millones de dólares y se prevé que este mercado incremente en una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 5.30 % en los próximos 5 años (EMR, 2023; IDFA, 2022).

Por su parte el jarabe de leche podría definirse como *“aquel producto obtenido mediante la eliminación parcial del agua de la leche (mediante tratamiento térmico u otro procedimiento) y la posterior adición de azúcar”*. Es utilizado principalmente en la industria pastelería y repostería para la elaboración de flanes, gelatinas, pudines, etc. Estas industrias forman parte de la panificación industrial que en 2021 tuvo una producción bruta de 86,256,589 miles de pesos (INEGI, 2021; NOM-183-SCFI, 2012).

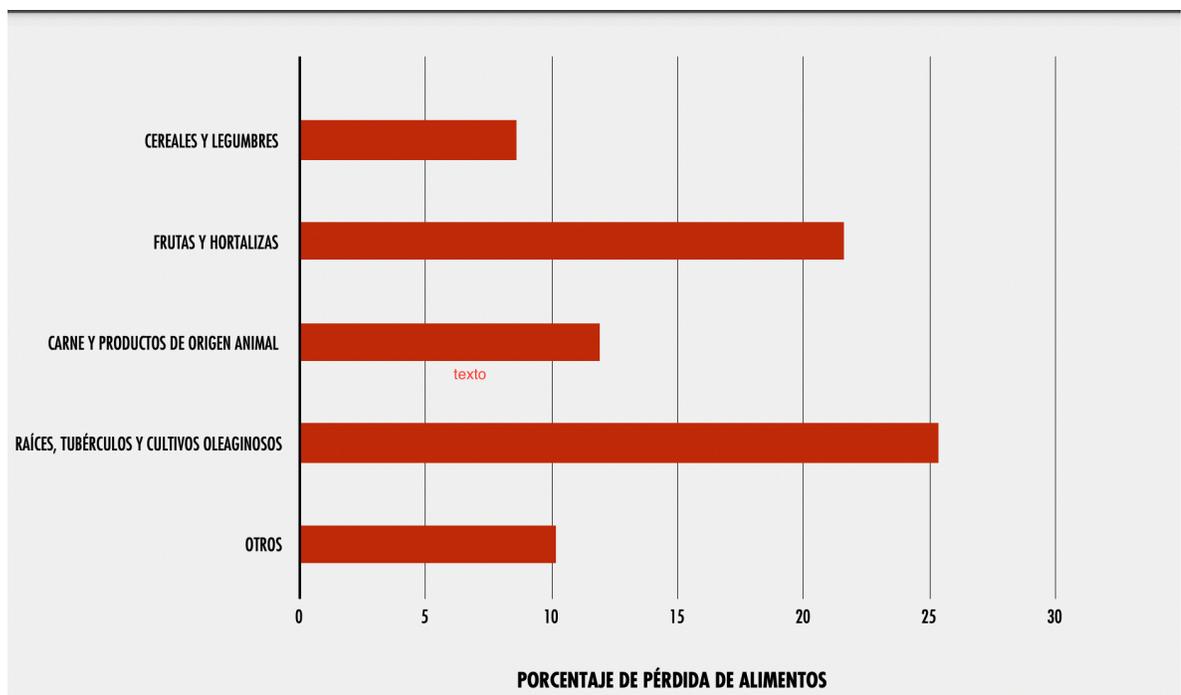
En general productos como el jarabe de leche y base para helados son considerados alimentos semi perecederos (pueden conservarse de semanas a meses almacenado en condiciones adecuadas), esto por la cantidad de azúcares que contienen. Sin embargo, se han reportado casos de pérdida de estos productos por el deterioro de los mismos, tema que se vuelve de relevancia en la industria de los alimentos por la naturaleza de los productos, el aporte económico que generan y las industrias a las que provee (Amit *et al.*, 2017).

## **II.2 Pérdida de alimentos**

La seguridad alimentaria es uno de los más grandes desafíos que enfrenta la sociedad debido al aumento de la población humana; cero hambre, es uno de los objetivos del desarrollo sostenible que pretende erradicar el hambre en el mundo. La pérdida de alimentos en sus diferentes etapas es un problema que debe solucionarse si se quiere cumplir el objetivo de cero hambre. Según la FAO (2019) la pérdida de alimentos consiste en:

*“Todas las cantidades de productos agrícolas, ganaderos y pesqueros aptos para el consumo humano que, directa o indirectamente, salen por completo de la cadena de suministro después de la cosecha, el sacrificio o la captura al ser descartados, incinerados o eliminados de algún otro modo, y no vuelven a ingresar en ninguna otra utilización, hasta el nivel minorista, pero sin incluirlo. Por consiguiente, se incluyen todas las pérdidas que se producen durante el almacenamiento, el transporte y la elaboración, así como los productos importados. La pérdida comprende el producto en su totalidad con sus partes no comestibles”. (p.11)*

En 2019, el Índice de pérdida de alimentos (IPA) de la FAO publicó la primera estimación mundial, en la cual se establece que el 13.8 % de los alimentos producidos en 2016 se perdió desde la granja hasta la etapa de venta al por menor. En la Figura 1 se muestra la pérdida de alimentos por grupos de productos desde la etapa posterior a la cosecha hasta la distribución en 2016, “el porcentaje de pérdida de alimentos se refiere a la cantidad física perdida para diferentes productos dividida por la cantidad producida” (FAO, 2019).



**Figura 1.** Pérdida de alimentos desde la etapa posterior a la cosecha hasta la distribución en 2016, porcentajes por grupos de productos (FAO, 2019).

La pérdida de alimentos, desde la granja hasta la mesa causa cuantiosos efectos ambientales y económicos, por ejemplo, los productos frescos y la leche líquida representan cada uno aproximadamente el 20 % de esta pérdida, mientras que los productos de cereales 15.2 %, por otro lado, las frutas y verduras procesadas constituyen 8.6 %. Estas pérdidas representan costos importantes, ya

que, si se pierde el 20 % de un cultivo, también se pierde el 20 % del fertilizante y el agua de riego utilizados para cultivar ese cultivo (FAO, 2019; Sahu & Bala, 2017).

En 2011, el Instituto Sueco para la Alimentación y la Biotecnología elaboró para la FAO un informe, en el cual se estimó que se perdía y/o desperdiciaba aproximadamente un tercio de los alimentos comestibles producidos para el consumo humano a nivel mundial. Esto representa aproximadamente 1, 300 millones de toneladas anuales de alimentos, abarcando las etapas desde la producción agrícola hasta el consumo (FAO, 2012). Por otro lado, según estimaciones del Servicio de Investigación Económica del USDA, alrededor de 96, 000 millones de libras de alimentos (más de una cuarta parte de los alimentos comestibles disponibles para consumo humano en los Estados Unidos), se pierden en tres etapas de comercialización: venta minorista, servicio de alimentos y consumidores (Petruzzi *et al.*, 2017). La FAO cuenta con una base de datos de estudios sobre pérdida de alimentos en el mundo, entre 2012 y 2022 se cuentan con 42 estudios de desperdicio de alimentos lácteos y reportan entre 0.1 y 37.1% de pérdidas (FAO, 2023b).

Los factores que intervienen en la pérdida y el desperdicio de alimentos se pueden clasificar en 2 categorías. Por una parte, se encuentran las causas directas, las cuales están relacionadas con las medidas (o la ausencia de ellas) de los representantes de la cadena de suministro de alimentos que directamente provocan la pérdida y el desperdicio de alimentos. Por otro lado, están los factores indirectos, que hacen referencia al entorno económico, político, y cultural del sistema alimentario. Las causas directas y los factores indirectos son la consecuencia del grado de interacción correcta de los elementos del sistema alimentario: insumos, infraestructuras, procesos, medio ambiente, instituciones, personas, etc. así como las actividades relacionadas con la cadena de suministro de alimentos. El deterioro, dentro de la cadena de suministro de alimentos, específicamente en el procesamiento, es un factor de importantes pérdidas, ya que no solo reduce la cantidad, sino también la calidad de los alimentos, especialmente la pérdida

cualitativa, la cual involucra la disminución de los atributos de los alimentos (deterioro) (FAO, 2019).

### **II.3 Deterioro de los alimentos**

Como se ha mencionado, gran parte de los alimentos se deterioran durante la cadena de distribución, principalmente, antes de llegar a los consumidores finales, por tal motivo, el deterioro de los alimentos comprende un problema global que requiere atención de manera inmediata (Odeyemi *et al.*, 2020).

El deterioro de los alimentos es un proceso metabólico que produce cambios en la calidad de los alimentos, volviéndolos indeseables y no aptos para el consumo, ya sea por humanos o animales, debido a olores desagradables y cambios en la textura, sabor y apariencia. Los alimentos deteriorados es posible que no causen enfermedades porque podrían no contener microorganismos patógenos, ni toxinas, sin embargo, por los cambios sensoriales que presentan, estos son rechazados. El deterioro es un proceso complejo producido por causas microbiológicas, químicas o físicas (Sahu & Bala, 2017).

El deterioro de los alimentos produce importantes pérdidas económicas para los productores, minoristas y consumidores. Factores como la temperatura de almacenamiento y transporte, disponibilidad de agua o humedad, pH, almacenamiento inadecuado, operaciones de procesamiento y microbiota autóctona y contaminante influyen en la tasa de deterioro (Odeyemi *et al.*, 2020).

La industria alimentaria está desarrollando continuamente nuevos productos y reformulando los tradicionales, reduciendo o sustituyendo conservadores para satisfacer la preferencia de los consumidores modernos por alimentos frescos, sin embargo, esto puede generar que sean más vulnerables al deterioro (Petruzzi *et al.*, 2017).

Durante años, la inocuidad alimentaria (ausencia de agentes patógenos en los alimentos) tomó el papel protagónico en la elaboración de alimentos, dejando como secundario el deterioro de estos. Sin embargo, actualmente se reconoce que el deterioro y la inocuidad alimentaria, desde un punto de vista microbiológico-ecológico, son dos áreas que no se pueden separar (Petruzzi *et al.*, 2017).

Los microorganismos son considerados la causa más común de deterioro en los alimentos, representando una proporción significativa de pérdida de alimentos. Al ser de tamaño microscópico y no poder observarlos a simple vista pueden pasar desapercibidos en cualquier paso de la cadena alimentaria. Aunque el deterioro microbiano no se considere un problema de salud, es de importancia para lograr la seguridad alimentaria (Dousset *et al.*, 2016; Odeyemi *et al.*, 2020).

Los microorganismos deterioradores dañan a los alimentos, debido a su desarrollo, la degradación de los nutrientes y la producción de otros compuestos, haciéndolos inaceptables para el consumo; estos microorganismos se pueden dividir principalmente en tres categorías: hongos filamentosos, levaduras y bacterias (De Oliveira Mota *et al.*, 2021).

- Hongos filamentosos

Los hongos son microorganismos que pueden crecer en una amplia variedad de condiciones subóptimas e inclusive adversas que ocurren en los productos alimenticios procesados (Dijksterhuis, 2017). Existe una gran diversidad de especies de hongos causantes de deterioro en los alimentos, el tipo y cantidad presentes en los alimentos depende de las características particulares del producto alimenticio (composición, características fisicoquímicas y tipo de proceso al que fue sometido) y de la exposición a fuentes de contaminación a lo largo de la cadena de producción. Una vez que un alimento se contamina con hongos, estos se multiplican, pudiendo llevar el producto a deteriorarse. Además, puede implicar un peligro para la salud del consumidor, ya que existen hongos productores de micotoxinas (metabolitos fúngicos secundarios, clasificados como peligros químicos de origen biológico). Son los

principales responsables de la falta de disponibilidad de alimentos frescos en países en desarrollo (Bernardi *et al.*, 2019; Ramos Girona *et al.*, 2020; Samson *et al.*, 2019).

- Levaduras

Las levaduras son organismos eucariotas que forman parte del grupo de los hongos y se encuentran muy diseminadas en la naturaleza. Las levaduras son esenciales en las fermentaciones de los alimentos, al ser utilizadas como cultivos iniciadores en quesos y pan, así como en cerveza y vino; pero también pueden causar el deterioro de alimentos como jugo de frutas, yogur, ensaladas y mayonesa. La capacidad que tienen algunas levaduras para poder sobrevivir en condiciones adversas las convierte en organismos potenciales causantes de deterioro de alimentos, responsables de grandes pérdidas económicas (Ballester *et al.*, 2022; Perricone *et al.*, 2017; Riesute *et al.*, 2021).

- Bacterias

Dentro del grupo de microorganismos deterioradores, las bacterias son responsables de los más rápidos y diversos procesos de deterioro en alimentos como la carne, el pescado, los mariscos, la leche y algunos productos lácteos. Existe una amplia gama de especies bacterianas involucradas en el deterioro de los alimentos, tanto especies Gram positivas, como Gram negativas. Algunas tienen la capacidad de desarrollar en una gran variedad de productos, mientras que otras son específicas de un tipo de producto (Dousset *et al.*, 2016).

Algunas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) pueden ejercer un papel importante en el deterioro de los alimentos, provocando cambios indeseables como enverdecimiento de la carne, formación de gases en los quesos. Incluso tienen la capacidad de producir un exopolisacárido que le da un aspecto viscoso a las carnes y a algunas bebidas. Las enterobacterias también desempeñan un papel importante en el deterioro de los alimentos por la capacidad que tienen para metabolizar los aminoácidos y carbohidratos, generando compuestos volátiles con olor desagradable (compuestos sulfúricos)

y aumento en la acidez (Remenant *et al.*, 2015). En general, las bacterias deterioradoras son inofensivas para el hombre, es decir, no representan un peligro para la salud. Sin embargo, en algunas situaciones, las bacterias causantes del deterioro de los alimentos pueden ser patógenas, un ejemplo de estas bacterias es: *Bacillus* y *Clostridium*. Por tal razón se insiste en que la inocuidad y el deterioro de los alimentos deben ser áreas que trabajen en conjunto y no de manera indistinta como ocurre con frecuencia (Petruzzi *et al.*, 2017).

### II.3.2 Deterioro bacteriano en productos lácteos

La leche es un excelente medio para el crecimiento de una gran diversidad de bacterias. La contaminación por bacterias deterioradoras en productos lácteos es un problema de calidad y seguridad alimentaria en todo el mundo, ya que dicha contaminación puede ocurrir en cualquier parte de la cadena alimentaria. La elevada demanda de leche y productos lácteos por la población humana ha traído consigo un creciente interés y preocupación por la calidad y la seguridad de estos productos (Suh, 2022).

El deterioro de la leche y los productos lácteos da como resultado la formación de malos olores, cambios en textura y apariencia, incluso sabores desagradables, por ejemplo: sabor agrio o ácido, sabores amargos resultado de proteólisis y lipólisis, o sabor a quemado o caramelo (Erkmen & Bozoglu, 2016).

Algunas especies de BAL producen un sabor no deseado en el queso, también pueden llegar a producir gas y líquido en el empaque (en el caso de *Leuconostoc* spp.). Por otro lado, podemos encontrar como bacterias deterioradoras a las denominadas psicrótrofas, capaces de crecer a temperaturas inferiores a 7 °C (Odeyemi *et al.*, 2020). Se ha reportado que dependiendo de las condiciones higiénicas en que la leche sea producida, se pueden encontrar en porcentajes del 10 % hasta el 75 %, estas bacterias son la principal razón de una corta vida útil en

la leche pasteurizada enfriada, ya que pueden llegar a sobrevivir a la pasteurización o volver a contaminar la leche después del tratamiento térmico. Algunas bacterias deterioradoras son capaces de producir enzimas proteolíticas y lipasas, en los productos lácteos, las proteolíticas causan aumento de la viscosidad, sabor amargo y gelificación, mientras que las lipasas provocan hidrólisis de las grasas (rancidez) (Odeyemi *et al.*, 2020).

*Pseudomonas* spp. son bacterias psicrótrofas que están ampliamente presentes en productos lácteos, al ser matrices con un alto contenido de compuestos nutricionales y el pH neutro permite su desarrollo. En la leche cruda, es frecuente encontrar especies de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, y *P. lactis*. Estas bacterias producen proteasas extracelulares termoestables, es decir, mantienen su capacidad de degradar las proteínas de la leche después del tratamiento térmico, y como consecuencia causan amargura y gelificación. Además, producen lipasas que pueden dañar productos lácteos con alto contenido de grasa, debido a la liberación ácidos grasos y glicerol, productos de su actividad. Los ácidos grasos de cadena corta se asocian a sabores y olores rancios, mientras que los ácidos grasos de cadena media generan un sabor jabonoso. Con frecuencia, algunas especies de *Pseudomonas* sintetizan pigmentos (pioverdina, piocianina, piomelanina, e indigoidina) a causa del estrés oxidativo que experimentan a bajas temperaturas (Quintieri *et al.*, 2021).

Las bacterias del género *Bacillus*, son otro ejemplo importante de microorganismos deterioradores con la capacidad de tolerar bajas temperaturas y a su vez ser resistentes al calor en la leche líquida. El deterioro común a los que se les ha asociado se describe como cuajada dulce, además de sabores amargos, rancios afrutados y de levadura. Desde hace más de 45 años se ha descrito la presencia de estos organismos en la leche cruda, cuando se reportó la detección de bacterias psicotróficas formadoras de esporas en el 83 % de muestras de leche cruda obtenidas de 18 productores individuales (Boor *et al.*, 2017).

Sin duda, existe una gran variedad de bacterias causantes de deterioro en los productos lácteos, pero las BAL es uno de los grupos de bacterias que se ha visto con mayor frecuencia asociadas a los procesos de deterioro, principalmente relacionadas con la temperatura inadecuada de almacenamiento, transporte y comercialización de los alimentos (Xu *et al.*, 2020).

#### **II.4 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no móviles ni productoras de esporas, presentes en una diversidad de entornos diferentes, destacando a los productos lácteos como uno de gran importancia al tener la capacidad de causar su deterioro. Existen al menos 33 géneros de BAL, con aproximadamente 200 especies, sin embargo, solo algunas de estas tienen esta capacidad deterioradora (Mende *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020).

Las BAL son ampliamente reconocidas como fermentadoras, producen ácido láctico como producto del catabolismo de la glucosa. Pueden clasificarse en: homofermentativas y heterofermentativas. Las primeras producen únicamente ácido láctico como producto final, mientras las segundas además del ácido láctico producen CO<sub>2</sub> y etanol y acetato a partir de la glucosa. Son exigentes en cuanto a factores de crecimiento como vitaminas y aminoácidos y de acuerdo con el tipo de fermentación que realicen (König & Fröhlich, 2017).

Las BAL son capaces de producir enzimas proteolíticas de manera intracelular y en el entorno externo que les permite la degradación de proteínas como la caseína, proporcionándoles aminoácidos para ser utilizados como fuente de carbono y de nitrógeno para su crecimiento en matrices como la leche y/o productos lácteos. El pH óptimo para el desarrollo y crecimiento es entre 7 y 7.5; por otro lado, a bajas temperaturas su crecimiento y desarrollo se ven ligeramente inhibidos y decrece su actividad enzimática. Esta capacidad adquiere importancia

ya que contribuye al deterioro de los alimentos, debido a que la degradación de proteínas puede formar péptidos que causan el sabor amargo de los productos lácteos (Kieliszek *et al.*, 2021).

Algunas BAL tienen la capacidad de producir polisacáridos (PS), un biopolímero sintetizado y secretado al exterior por las bacterias durante su crecimiento, puede variar en grado de ramificación molecular (lineal o ramificada) y en composición de monosacáridos. Estos a su vez pueden ser homopolisacáridos cuando su composición de monosacáridos es idéntica o heteropolisacáridos, con presencia de diferentes monosacáridos. Los PS contribuyen a propiedades físicas de los alimentos como la viscosidad, en alimentos fermentados se ha empleado para retener sabores y prolongar la vida de anaquel. Sin embargo, en diversos productos lácteos la viscosidad es una característica que se desea evitar, ya que, al estar presente, el alimento se considera deteriorado (Zhou *et al.*, 2019).

Géneros como *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacilli* y *Pediococcus* utilizan la vía de síntesis extracelular para sintetizar homopolisacáridos, siendo esta la vía universal de biosíntesis de PS en BAL, y se da en dos pasos. 1) Se lleva a cabo una polimerización, siendo la fructansucrasa y la glucansucrasa las enzimas responsables de permitir que el monosacárido específico sea transferido a las cadenas de polisacáridos en crecimiento, 2) liberación de las cadenas polimerizadas al entorno extracelular (Zeidan *et al.*, 2017).

## **II.5 Género *Leuconostoc***

El género *Leuconostoc* perteneciente al grupo de las BAL se caracteriza por tener miembros con forma cocoide Gram positivos, que pueden encontrarse solos, en pares o en cadenas cortas, en algunos casos con morfología irregular, no móviles, catalasa negativa y no formadores de esporas. Las especies de *Leuconostoc* son mesófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 30 °C), no termofílicas, con capacidad de crecer a temperatura de refrigeración si las

condiciones así lo requieren, habitualmente son no acidofílicas, prefiriendo un pH entre 6 y 7 (Björkroth *et al.*, 2014).

Este género de bacterias son anaerobias facultativas, para su crecimiento requieren factores y aminoácidos complejos, heterofermentativas obligadas utilizando la vía del fosfato de pentosa para producir ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y trazas de ácido acético a partir de la glucosa (Nicolescu *et al.*, 2023).

Algunas especies de *Leuconostoc* son capaces de sintetizar dextranos a partir de sacarosa, los dextranos son exopolisacáridos (EPS), moléculas de carbohidratos poliméricos secretados en el entorno extracelular de la bacteria como limo. Son llamados con frecuencia exopolisacáridos de limo, su papel es el almacenamiento de energía y la protección de la célula bacteriana contra un ambiente desfavorable (temperatura, luz, pH, desecación, presión osmótica, compuestos tóxicos, etc.). La producción y subsecuente secreción de EPS comienzan durante el crecimiento bacteriano y se detienen en la fase estacionaria (Nicolescu *et al.*, 2023). Se componen principalmente de una cadena lineal de D-glucosa, enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1→6) y enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1→3), son solubles en agua y la enzima implicada en su biosíntesis es la dextransucrasa. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* son ejemplos de especies del género *Leuconostoc* capaces de producir dextrano hasta 20 g/L. Cualidad que es aprovechada para numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras (Díaz-Montes, 2021).

Sin embargo, aunque los EPS tienen numerosas aplicaciones benéficas, también pueden estar implicados en procesos de deterioro, como es el caso del vino en la enfermedad conocida como "ropiness". Al producirse el EPS la viscosidad en el vino aumenta, induciendo eventualmente una sensación aceitosa, el cual se puede percibir a simple vista y provoca el rechazo del consumidor, causando pérdidas importantes en la industria vitivinícola (Dimopoulou & Dols-Lafargue, 2021).

### II.5.1 Identificación y caracterización

La identificación del género *Leuconostoc*, al igual que el resto de las bacterias perteneciente al grupo de las BAL se fundamenta principalmente en características fenotípicas como la morfología (cocos, diplococos, tétradas), su reacción a la tinción Gram (Gram positivas) y características bioquímicas como la fermentación de azúcares. Estas características pueden evaluarse mediante pruebas tradicionales en medios de cultivo o empleando sistemas alternativos como API y BIOLOG (Testa *et al.*, 2014). Mientras que el crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad de crecer a concentraciones altas de sal, tolerancia a diferentes ácidos, álcalis o etanol, producción de polisacárido, tolerancia biliar y requisitos de condiciones de crecimiento son factores que pueden ayudar a la caracterización de *Leuconostoc* (König & Fröhlich, 2017).

En cuanto a la identificación y caracterización genotípicas el análisis de secuenciación del gen 16S rDNA se utiliza comúnmente para evaluar la diversidad bacteriana. Sin embargo, actualmente existen métodos de tipificación molecular que ayudan de manera eficiente a la completa identificación y caracterización de distintas especies bacterianas. Entre los distintos métodos destacan el ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD-PCR), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (PCR-RFLP), PCR de elementos repetitivos (rep-PCR), tipificación de secuencias de locus único y multilocus (MLST), patrón de proteínas solubles (Kaur *et al.*, 2017; Kawasaki *et al.*, 2023; König & Fröhlich, 2017).

El método de RAPD-PCR es un método que se ha utilizado desde hace años en la identificación y caracterización de cepas bacterianas. En esta técnica se utiliza un cebador único corto de secuencia arbitraria que se une en ubicaciones aleatorias a lo largo del genoma, generando como resultado perfiles de bandas que consisten en secuencias repetitivas o únicas dependientes de la homología entre el ADN molde y la secuencia del cebador. En comparación con otras técnicas de

caracterización molecular, el RAPD ofrece ventajas tales como el bajo costo, cantidad limitada de ADN, requiere poca experiencia para desarrollar la técnica. Además de que se necesitan instalaciones mínimas en un laboratorio para su implementación y se puede obtener información de las bacterias a analizar en poco tiempo (Kaur *et al.*, 2017; Kumari, 2014).

## **II.6 Control de bacterias ácido lácticas en la producción de alimentos**

Debido a la importancia que han adquirido las BAL como microorganismos capaces de deteriorar alimentos, se vuelve relevante poder controlar su presencia y desarrollo en la producción de alimentos y así poder garantizar la vida útil deseada e incluso poder prolongarla. Se ha señalado que los ambientes de procesamiento de los alimentos deben de considerarse como una fuente importante de contaminación, debido a procedimientos de limpieza y desinfección insuficientes o probable contaminación cruzada en las áreas de producción. En plantas de alimentos se ha comprobado que los microorganismos pueden estar presente como cepas transitorias o cepas persistentes. En el primer caso, la cepa permanece por un tiempo corto y limitado en la planta ya que se puede eliminar por medio de la aplicación de procedimientos de limpieza y desinfección. Por otro lado la cepa persistente resiste los procedimientos de saneamiento, creando en algunos casos biopelículas que les permiten persistir en planta hasta por varios años (De Oliveira Mota *et al.*, 2021; Sahu & Bala, 2017).

### II.6.1 Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos son un método frecuente de control microbiano en las plantas de procesos de producción de alimentos, tanto para microorganismos deterioradores, como patógenos. Dentro de este grupo el tratamiento térmico es el más utilizado, el cual tiene como objetivo destruir y/o eliminar microorganismos patógenos y deterioradores presentes en los alimentos, garantizando su consumo seguro y prolongando la vida útil.

En productos lácteos y otros alimentos es necesario que la aplicación del tratamiento no genere defectos físicos u organolépticos y conserve su calidad nutricional (Rauh & Xiao, 2022).

### II.6.2 Tratamientos químicos

Los tratamientos químicos son métodos convencionales de control microbiano que se han utilizado desde hace años en la industria alimentaria. El cloro destaca dentro de este método por tener alta eficiencia antimicrobiana además de ser de bajo costo (Visvalingam & Holley, 2018). Sin embargo, se ha reportado que su interacción con los alimentos puede generar compuestos tóxicos (López-Gálvez & Gil, 2020).

El agua electrolizada (EW, por sus siglas en inglés) es una tecnología emergente aplicada en diversos campos, incluyendo los procesos de producción de alimentos. Es un desinfectante que es utilizado para sanitizar superficies, es producida en una cámara de electrólisis que contiene sal diluida y agua del grifo. Su poder desinfectante es debido a su acción contra enzimas bacterianas y daño a membranas celulares, como ocurre con los agentes oxidantes. El EW puede ser utilizada en conjunto con otros métodos tanto físicos como químicos (ácidos orgánicos y tratamiento térmico) para aumentar la efectividad del tratamiento (Athayde *et al.*, 2018; Chen & Wang, 2022; Yan *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Menegaro *et al.* (2016) encontraron que el hipoclorito de sodio, ácido peracético y biguanida fueron los principales agentes químicos utilizados para la desinfección de equipos y utensilios en la industria alimentaria de Paraná, mientras que el hipoclorito de sodio, ácido peracético y soluciones de amoníaco cuaternario fueron utilizados para desinfectar las instalaciones.

Como método de control microbiológico en los alimentos se pueden añadir conservantes químicos, por ejemplo: nisina, que tiene como objetivo controlar el crecimiento microbiano, tanto de patógenos, como de deterioradores (Pornpukdeewattana *et al.*, 2020) .

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 Objetivo general**

Caracterizar cepas de *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helados y evaluar su tolerancia a estrategias para su control.

#### **III.2 Objetivos particulares**

- Aislar e identificar cepas de *Leuconostoc* spp. a partir de base para helado y jarabe de leche.
- Caracterizar la capacidad deterioradora de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de base para helado y jarabe de leche.
- Caracterizar genéticamente cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de base para helado y jarabe de leche.
- Evaluar la tolerancia de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de base para helado y jarabe de leche a calor y conservadores.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1 Materiales**

#### IV.1.1 Equipos e instrumentos

- Agitador mecánico Vortex®, Velp Scientifica®, ns/113123
- Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge®, Mod. 199-85
- Balanza analítica, sensibilidad 0.0001 g Sartorius® y BL120S
- Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g OHAUS®, Mod. CT200-S
- Baño maría con termostato, Arfrank®, Mod. 91
- Biolog®, MicroStation, Mod. 637
- Bolsas de polietileno 25 x 35 cm
- Campana de flujo laminar, Alder®, Veco®
- Cuenta colonias, Quebec® Reicher-Jung®
- Equipo de electroforesis, BioRad®, CHEF-DR-II®
- Homogeneizador Stomacher® Laboratory Blender®, Mod. 400 (BA 7021)
- Horno para esterilización, Shel-lab®
- Incubadora con refrigeración, Precision Scientific®
- Micropipetas 1-1000 µl, Lab systems®, Brand®, Genex Beta®, Rainin®, Gilson®
- Microscopio óptico Axiostar plus®, Mod. 1169-149
- Refrigerador OSEDA® Refrigeración
- Refrigerador REVCO®, Thermo Scientific®
- Termociclador Tech-gene®, Mod. 512
- Ultracentrifuga Heraeus®, Biofugue pico®, Kendro®
- Material de uso común en el laboratorio de microbiología

#### IV.1.2 Medios de cultivo

- Agar de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Difco®
- Caldo de Man-Rogosa-Sharp (MRS), Difco®
- Diluyente de peptona 0.1 % (DP), Bacto®
- Caldo soya tripticasa

#### IV.1.3 Reactivos

- Ácido clorhídrico 5 y 20 %
- Acetato de Sodio 3M
- Agarosa Ultrapura, Invitrogen®
- Alcohol-cetona 1:1
- Alcohol etílico absoluto
- Alcohol Isoamílico
- Bromuro de etidio a 1 ppm
- Amortiguador de corrimiento 10x BlueJuice®, Invitrogen®
- Cristal violeta, Sigma®
- Lugol
- Marcador de peso molecular, DNA ladder 100 y 1000 pb Invitrogen®
- Platinum PCR supermix, Invitrogen®
- Safranina, Sigma®
- Tris-HCl, Sigma®

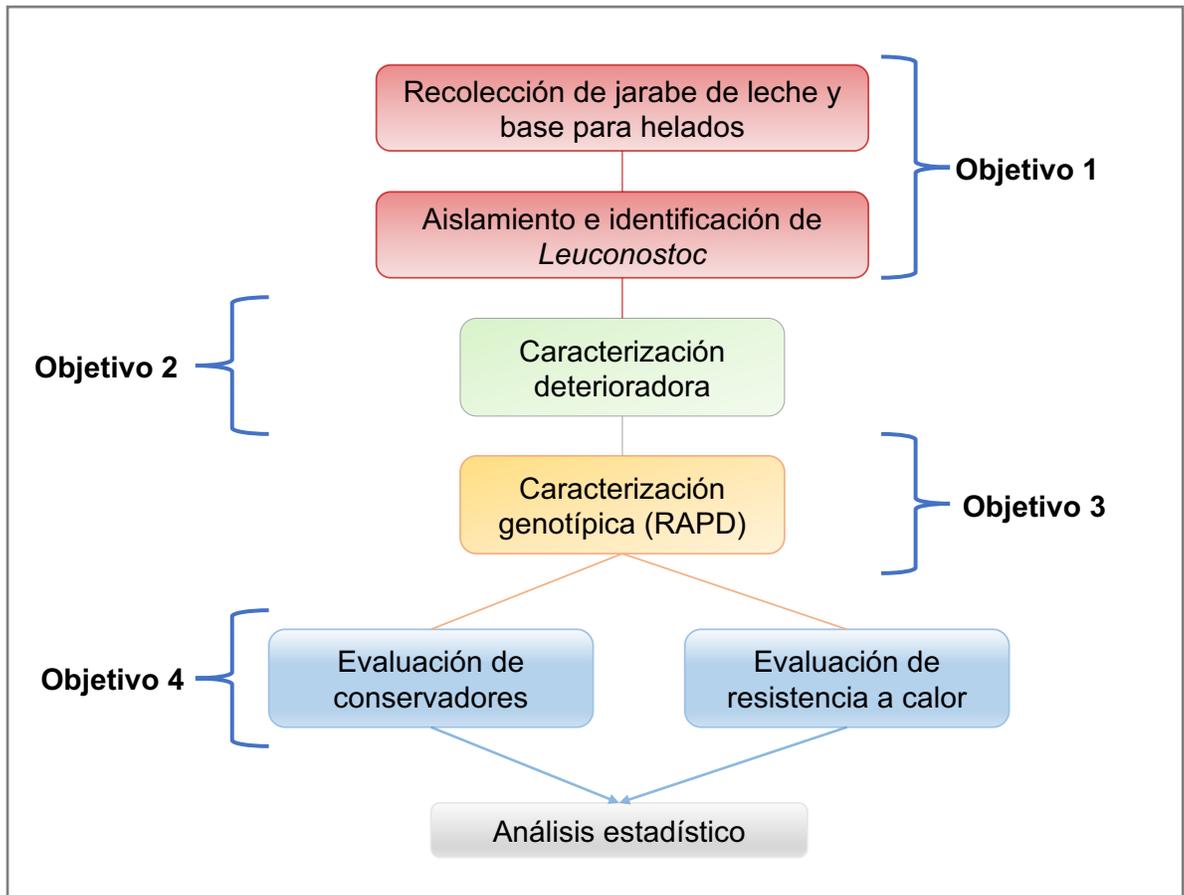
#### IV.1.4 Material para pruebas de deterioro y termo tolerancia

- Jarabe de leche: producto pasteurizado para repostería que tiene como ingredientes agua, azúcares añadidos (azúcar, jarabe de fructosa), leche descremada en polvo, aceite vegetal, estabilizantes, emulsificantes, sal yodada, fosfato disódico, 0.1 % de sorbato de potasio como conservador, saborizantes artificial y natural, colorante natural (beta caroteno), colorante artificial amarillo 5 (tartrazina).

## IV.2 Métodos

### IV.2.1 Estrategia experimental general

En la Figura 2 se muestra la estrategia experimental general del proyecto.



**Figura 2.** Estrategia experimental general.

### IV.2.2 Recolección de muestras de productos lácteos azucarados

Se realizó la recolección de 93 muestras de productos lácteos azucarados: base para helado (n= 41) y jarabe de leche (n= 52) elaborados en una empresa de la región del bajo. Se colectó base para helado y jarabe de leche recién elaborados y durante su almacenamiento (4 °C/ 7 d), en el periodo de diciembre 2021- julio 2022. Las muestras recolectadas asépticamente y debidamente identificadas fueron colocadas en bolsas estériles de muestreo y se almacenaron en hielo durante su traslado al laboratorio para su posterior análisis dentro de las primeras 24 h.

#### IV.2.2.1 Aislamiento de *Leuconostoc* spp.

De manera aséptica, se pesaron 10 g de cada una de las muestras recolectadas en bolsas estériles y se les añadió 90 mL de diluyente de peptona, la mezcla se homogenizó en Stomacher® a velocidad media durante 1 min. De la suspensión resultante se realizaron diluciones decimales consecutivas y se tomaron 100 µL de diluciones seleccionadas para ser inoculadas en placas de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y agar MRS adicionado con 10 % de sacarosa. Se utilizó la técnica de extensión en superficie y se incubaron a 30 °C ± 2 por 48 h. Se seleccionaron aleatoriamente (~10 %) colonias con características típicas de *Leuconostoc* spp. y se purificaron mediante 3 pases sucesivos en agar MRS.

#### IV.2.2.2 Identificación fenotípica de *Leuconostoc* spp.

Las cepas aisladas y purificadas se identificaron mediante tinción de Gram y prueba de catalasa con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3 % v/v. Fueron seleccionadas aquellas bacterias Gram positivas en forma cocoide dispuestas en pares, tripletes o tétradas y catalasa negativa. Las cepas que cumplieron con estas características se conservaron a -20 °C en caldo MRS + glicerol al 20 % v/v.

#### IV.2.2.3 Proceso de activación y lavado de cepas

Las cepas aisladas fueron conservadas a -20 °C en caldo MRS + glicerol al 20 %. Para las evaluaciones y estudios, se activaron mediante la transferencia 50 µL del cultivo MRS + glicerol al 20 % (previamente descongelado) en un tubo con 5 mL de caldo MRS, con posterior incubación a 30 °C ± 2 por 24 h. Este procedimiento se realizó 3 veces sucesivas y el último pase se dejó incubar solo 18 h; del último cultivo se transfirió 1 mL a tubo eppendorf, el cual se centrifugó a 12 000 x g/ 2 min. El botón celular fue lavado 2 veces con solución salina fisiológica (SSF: 0.85 % NaCl). De la suspensión obtenida, se realizó un recuento para conocer la concentración bacteriana en agar MRS mediante la técnica de extensión en superficie.

### IV.2.3 Identificación de cepas de *Leuconostoc* spp. a nivel género

Las cepas identificadas fenotípicamente como *Leuconostoc* spp. (IV.2.2.2), se les realizó extracción de ADN y de manera individual se llevaron a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando iniciadores específicos para este género (Tabla 1).

#### IV.2.3.1 Extracción de ADN

Se centrifugó 1 mL de cada una de las cepas previamente activadas (IV.2.2.4) a 12 000 x g/ 2 min, la biomasa obtenida se suspendió en 300 µL de amortiguador TNES y posteriormente se realizó una lisis por calentamiento en termobloque (95 °C/ 10 min). Finalizado el calentamiento, se centrifugó a 12 000 x g/ 1 min y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 90 µL de acetato de sodio 3 M y se incubó a -20 °C/ 10 min. Posterior a la incubación se centrifugó a 12 000 x g/ 1 min y se recuperó el sobrenadante, se añadió 400 µL de isopropanol y a continuación se incubó a -20 °C/ 10 min, se centrifugó a 12 000 x g/ 5 min, eliminando el sobrenadante y suspendiendo el sedimento en 1 mL de etanol al 70 % con agitación suave, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 5 min y posterior centrifugación (12 000 x g/ 5 min). Se eliminó el sobrenadante y se secó en termobloque 60 °C/ 30 min. El ADN obtenido se suspendió en 50 µL de agua Milli-Q y se preservó a -20 °C. El ADN de cada cepa fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm en NanoDrop para asegurar una concentración mínima de 50 ng/µL.

#### IV.2.3.2 Identificación de cepas no *Leuconostoc* spp.

Las cepas que fueron identificadas fenotípicamente como *Leuconostoc* spp., pero no confirmadas a nivel de género, se les realizó PCR utilizando iniciadores para los principales géneros de BAL que se encuentran en productos lácteos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Iniciadores específicos para *Leuconostoc* y principales géneros de BAL.

Género	Inicia- dores	Secuencia 5' → 3'	Condiciones de amplificación y tamaño de producto	Referencia
<i>Leuconos- toc</i> spp.	Leuc A	CAC TTT GTC TCC GAA GAG	Desnaturalización inicial: 94 °C/ 5 min, 35 ciclos: desnaturalización 94 °C/ 30 s; alineación 56 °C/ 45 s; extensión 72 °C/ 45 s y extensión final 72 °C/ 5 min.  613 pb	(Macián <i>et al.</i> , 2004)
	Leuc S	AAG CAG TGT TGT ATG GGA		
<i>Carnobac- terium</i>	Carn A	GAG CAG TTA CTC TCA TCC	Desnaturalización inicial: 94 °C/ 5 min, 35 ciclos: desnaturalización 94 °C/ 30 s; alineación 56 °C/ 45 s; extensión 72 °C/ 45 s y extensión final 72 °C/ 5 min.  324 pb	(Macián <i>et al.</i> , 2004)
	Carn S	ATA ACA TTC GGA AAC GGA T		
lactobacilli	Lact A	AGTGGAAGTC CATGTGTAG	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 3 min, 35 ciclos: desnaturalización 95°C/ 15 s; alineación 62 °C/ 15 s; extensión 72 °C/ 20 s y extensión final 72 °C/ 5 min.  324 pb	(Cousin <i>et al.</i> , 2019)
	Lact S	CYCTCAAAC TAAACAAAGTT TC		
<i>Weissella</i>	Weis A	GAT GGT TCT GCT ACC ACT AAG	Desnaturalización inicial: 94 °C/ 2 min, 33 ciclos: desnaturalización 94°C/ 1 min; alineación 50 °C/ 1 min; extensión 72 °C/ 1.5 min y extensión final 72 °C/ 5 min.  1200 pb	(Schillinger <i>et al.</i> , 2008)
	Weis S	GGN TAC CTT GTT ACG ACT TC		
<i>Pedioco- ccus</i>	Pedio A	GAAGTCGTGT ACGTTGAAA GTGCTGA	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 3 min, 35 ciclos: desnaturalización 95°C/ 15 s; alineación 62 °C/ 15 s; extensión 72 °C/ 20 s y extensión final 72 °C/ 5 min.  701 pb	(Cousin <i>et al.</i> , 2019)
	Pedio S	GCGTCCCTCC ATTGTTCAAAC AAG		

#### IV.2.4 Evaluación de la capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc* spp.

Para evidenciar la capacidad deterioradora de las cepas aisladas, estas se inocularon de manera independiente (4 log UFC/mL) en 100 mL del producto, empleando jarabe de leche como matriz alimentaria, el cual se encontraba recién elaborado y dispuesto en bolsas Whirlpack estériles para un adecuado manejo. Se incubaron a 10 °C por 14 días y al término de la incubación se realizaron las mediciones de viscosidad, pH y la cuantificación de las poblaciones bacterianas alcanzadas (IV.2.2.1).

- Medición de viscosidad

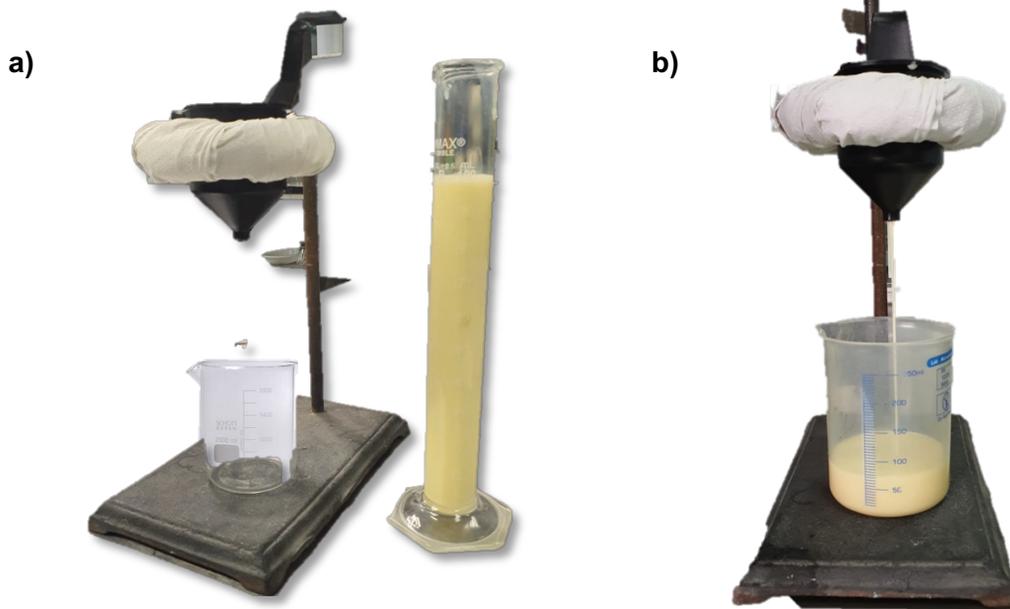
La viscosidad de las muestras inoculadas de jarabe de leche se midió mediante una copa de flujo Ford (TCP SG-244, Máster Airbrush) con una capacidad de 100 mL y un diámetro de abertura de salida de 4.1 mm (copa Ford #4). Las mediciones consistieron en llenar la copa Ford con 100 mL de jarabe de leche, previamente homogenizado y atemperado a 25 °C y dejar pasar el volumen total (Figura 3), registrando el tiempo necesario para ello, con ayuda de un cronómetro digital (Bancalari *et al.*, 2020). Para obtener el valor de la viscosidad, el tiempo registrado se sustituyó en la Ecuación 1.

$$V = 3.7 * t - \frac{400}{t} \quad (1)$$

donde

V= viscosidad cinemática, en centistokes (cSt)

t= tiempo de flujo, en segundos (s)



**Figura 3. a)** Instalación copa Ford para medir viscosidad **b)** Medición de viscosidad al eludir jarabe de leche a través de la copa.

#### IV.2.5 Caracterización genotípica mediante Amplificación Polimórfica Aleatorizada de ADN (RAPD)

La evaluación de la diversidad genética de las cepas aisladas e identificadas a nivel género como *Leuconostoc* spp., se realizó mediante la técnica de RAPD, usando un cebador específico para el género *Leuconostoc* spp. y dirigido a regiones conservadas de genes que codifican la enzima dextransucrasa (Holt & Cote, 1998), se utilizó la metodología empleada por Padilla-Frausto (2010). El iniciador aleatorio para *Leuconostoc* spp. y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 2. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %/ 100 mV/ 45 min, se revelaron con bromuro de etidio (1 ppm) utilizando un fotodocumentador para visualizar los perfiles RADP (patrones de banda) y se analizaron mediante la aplicación GelAnalyzer 19.1.

**Tabla 2.** Iniciador aleatorio y condiciones de amplificación para *Leuconostoc* spp.

Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Composición mezcla de reacción	Condiciones de PCR
1299	(AGCT)CC(AG)TC(CT)TG (AGCT)CC(AG)AA(AG) TA (AGCT)ACCCA	250µM de cada dNTP, 1.5 U de Taq ADN polimerasa (11 µL), 0.75µM del iniciador (1µL) y 1µL ADN molde. Vol. de reacción 13 µL.	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 1 min, 40 ciclos: desnaturalización 94 °C/ 1 min; alineación 30 °C/ 1 min; elongación 72 °C/ 5 min y extensión final 72 °C/ 10 min.

IV.2.6 Evaluación a conservadores y resistencia a calor de cepas *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado.

#### IV.2.6.1 Evaluación a conservadores

La evaluación a conservadores se llevó a cabo en microplacas estériles con caldo MRS adicionado previamente con los conservadores: nisina 6 ppm y Lactiplus 0.5 % (mezcla de ácido propiónico y sales de sodio). Las cepas previamente activadas y lavadas (IV.2.2.4) se inocularon individualmente en cada uno de los caldos en una concentración de 6 log UFC/mL, como control se incluyó caldo MRS sin conservador. Las microplacas se incubaron a 30 °C ± 2/ 48 h y se midió la densidad óptica (600 nm) a las 0, 3, 11, 24 y 48 h, al final de la incubación se realizó el recuento viable de células en cada tratamiento (IV.2.2.1). Los tratamientos se aplicaron por triplicado.

#### IV.2.6.2 Evaluación de resistencia a calor

Se evaluó la resistencia térmica siguiendo la metodología empleada por Zacarías-Muñoz (2011) con algunas modificaciones. Para esta prueba se utilizó jarabe de leche como matriz alimentaria, colocando 1 mL en tubos de ensayo estériles (13 x 100 mm), los cuales se inocularon por triplicado con cada una de las cepas a evaluar en una concentración de 8 log UFC/mL. Los tubos de ensayo fueron puestos en baño María a 57 °C por 15 min y cada 5 min un tubo de ensayo fue retirado del baño María y colocado en un baño de hielo para la posterior cuantificación de las poblaciones sobrevivientes. La cuantificación se realizó mediante diluciones seriadas en agar MRS, utilizando la técnica de Miles y Misra. Los datos obtenidos del experimento con tres repeticiones se analizaron para determinar la velocidad máxima de muerte ( $\mu_{max}$ ) de cada una de las cepas utilizando el programa DMFit.

#### IV.2.7 Análisis estadístico

Para determinar las similitudes y/o disimilitudes de los perfiles RAPD generados en la caracterización genotípica se utilizó el índice Jaccard y el método de Ward para generar el dendograma correspondiente.

Para la evaluación de la capacidad de deterioro, tolerancia a conservadores y calor, se calculó la media  $\pm$  la desviación estándar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico R Studio versión 4.2.1 (Posit, 2023).

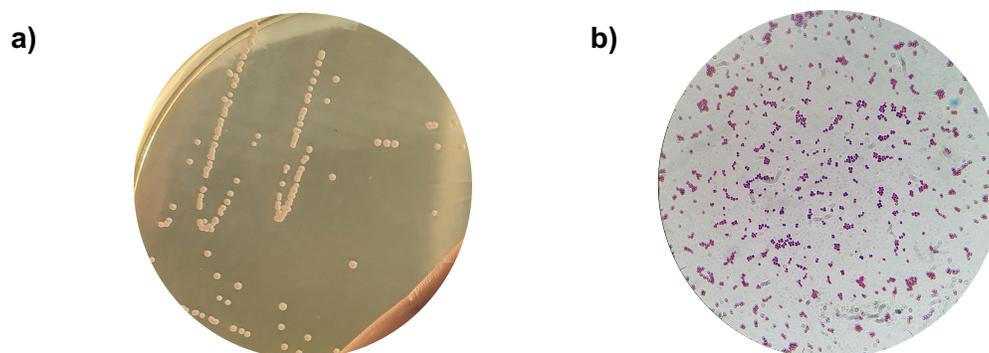
## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Aislamiento e identificación de cepas de *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado

A partir de los productos analizados de jarabe de leche y base para helado se aislaron un total de 48 cepas (Tabla 3) que respondieron fenotípicamente a las características típicas de *Leuconostoc*: bacteria Gram +, cocoide, dispuesta en pares, tripletes y/o cadenas cortas, catalasa negativa y morfología colonial lisa, convexa, de forma redonda, color blanquecina (Figura 4).

**Tabla 3.** Muestras analizadas y cepas de *Leuconostoc* spp. recuperadas en base a características fenotípicas.

Producto	No. de muestras	Cepas aisladas
Jarabe de leche	52	37
Base para helado	41	11
<b>Total</b>	<b>93</b>	<b>48</b>



**Figura 4.** Morfología típica de cepas de *Leuconostoc* spp.: a) colonial, b) microscópica.

Para confirmar la identidad de las 48 cepas aisladas se identificaron genéticamente a nivel género, encontrando que 46 de las 48 cepas (95.8 %) pertenecían al género *Leuconostoc*, 1 cepa al género lactobacilli y 1 cepa restante no logro ser identificada, al no pertenecer a ninguno de los géneros de BAL analizados (géneros comúnmente encontrados en productos lácteos).

La Tabla 4 muestra la identificación a nivel género de cada una de las cepas que fueron recuperadas, la planta de la que provenía el alimento, el producto del cual se aisló y si este producto mostraba síntomas de deterioro o no (aumento de viscosidad). El 37 % (n=17) de las cepas identificadas a nivel género como *Leuconostoc* provenían de producto deteriorado (47 % jarabe de leche y 53 % base para helado), mientras que el 63 % (n= 29) se aisló de producto no deteriorado (97 % jarabe de leche y 3 % base para helado). Las concentraciones de BAL encontradas en producto deteriorado fueron 3.72 – 6.44 log UFC/g, en tanto para producto no deteriorado 1.68 – 6.04 log UFC/g.

Se observó una relación entre el tipo de producto y planta de origen de las cepas aisladas de producto deteriorado, es decir, las cepas aisladas de base para helado solo provenían principalmente de la planta A, mientras que las cepas aisladas de jarabe de leche provenían principalmente de la planta B. No se observó esta misma relación para las cepas aisladas de producto no deteriorado. En general, se aisló una mayor cantidad de cepas de jarabe de leche (n=36) que de base para helado (n=10).

**Tabla 4.** Identificación genética de cepas aisladas de jarabe de leche y base para helado

<b>Cepa</b>	<b>Tipo de producto</b>	<b>Planta de origen</b>	<b>D/ ND</b>	<b>Bacteria</b>
J1	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J2	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B3	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B4	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J5	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J6	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J7	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J8	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J9	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J10	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J11	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J12	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J13	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J14	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J15	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J16	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J17	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
B18	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B19	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J20	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J21	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
B22	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J23	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
B24	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B25	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J26	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J27	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
B28	BH	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
B29	BH	B	ND	lactobacilli
J30	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J31	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J32	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J33	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J34	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J35	JL	B	ND	-

J36	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J37	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J38	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J39	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J40	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J41	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J42	JL	B	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B43	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
B44	BH	A	D	<i>Leuconostoc</i> spp
J45	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J46	JL	A	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J47	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp
J48	JL	B	ND	<i>Leuconostoc</i> spp

JL=jarabe de leche, BH=base para helado, D=producto deteriorado ND= producto no deteriorado

Desde hace años, es bien sabido que el género *Leuconostoc* así como otras BAL son causantes de deterioro en productos cárnicos o vegetales, provocando principalmente formación de limo, gas y acidificación (Chen *et al.*, 2022; Vihavainen *et al.*, 2008). Sin embargo, existen pocos estudios donde se le relacione con el deterioro de productos lácteos azucarados, probablemente al tener altas concentraciones de azúcar, estos son considerados seguros. No obstante, si estos productos a su vez son usados como materias primas para la elaboración de otros productos, donde se les diluya y se proporcionen condiciones que permitan el desarrollo, este microorganismo se va a multiplicar provocando afectaciones en la calidad del producto. En 2008, Arakawa *et al.* estudiaron la microbiota deterioradora de crema pastelera (deteriorada y refrigerada), encontrando a especies de *Bacillus*, estafilococos y BAL como *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides* como principales bacterias de descomposición en las cremas pasteleras analizadas. Existen otros reportes de deterioro en postres lácteos como natillas o pudines (Moschonas *et al.*, 2021; Techer *et al.*, 2020) donde sí bien el microorganismo principal de deterioro no es *Leuconostoc* spp., si se ha encontrado dentro de la microbiota asociada a afectaciones de su calidad.

## **V.2 Evaluación de la capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc* spp.**

La capacidad deterioradora se evaluó mediante la determinación de pH, viscosidad y poblaciones bacterianas alcanzadas al final de la incubación una vez inoculada cada una de las cepas en jarabe de leche.

Las poblaciones bacterianas alcanzadas fueron homogéneas para la mayoría de las cepas evaluadas (7.3 - 8.4 log UFC/mL), a excepción de la cepa J16 que alcanzó poblaciones de 4.1 log UFC/mL, mientras que el control (producto no inoculado) se mantuvo por debajo del límite de detección (2 log UFC/mL).

En la Figura 5 se muestran los valores de menor a mayor del pH obtenido de cada una de las cepas. Las primeras 31 cepas de izquierda a derecha (cuadro rojo) lograron acidificar el producto de manera considerable por debajo de 5 (pH 4.4 - 4.9). El 41.94 % de estas cepas se aislaron de producto deteriorado, mientras que el 58.06 % de producto no deteriorado. Las siguientes 14 cepas (cuadro verde) el pH final del producto osciló entre 5 y 6. Por último, la cepa J16 (cuadro azul) se comportó de manera muy similar al control, con un pH final en el producto de 6.3.

Una de las principales características de *Leuconostoc* y en general del grupo de las BAL es su capacidad fermentadora, produciendo principalmente ácido láctico a partir de la glucosa (Nicolescu *et al.*, 2023), es por esto que cuando llegan a un alimento y desarrollan, lo acidifican. Esta característica se ha utilizado por muchos años de manera favorable en la industria alimentaria para la producción de alimentos fermentados como el yogurt o el queso donde estos microorganismos fermentadores se inoculan intencionalmente para acidificar el medio y otorgarle al alimento sabores u olores deseables. No obstante, en alimentos no fermentados como jarabe de leche, base para helado, cremas pasteleras, etc., esta característica se vuelve un inconveniente, debido a que la acidificación no es algo que se desee en este tipo de alimentos, convirtiéndolo en un problema de calidad (Moschonias *et al.*, 2021).

En 2020, Techer *et al.*, estudiaron el deterioro de un famoso postre francés llamado “île flottante” (contiene crema pastelera como ingrediente principal). Los fabricantes reportaban modificaciones de pH y cambios sensoriales (principalmente olores) como características de deterioro. Al estudiar el deterioro evidenciaron a *Leuconostoc* spp. como bacteria asociada al deterioro del postre, seguido del grupo de *B. cereus*, *Staphylococcus* coagulasa negativa y *Enterococcus*. Además, al evaluar el efecto individual de cada bacteria responsable de deterioro en el postre, se advirtió que *Leuconostoc* spp. alcanzó poblaciones de 8.6 – 9.6 log UFC/ mL y consiguió disminuir significativamente el pH inicial de  $6.95 \pm 0.10$  a  $4.95 \pm 0.10$  después de 21 días a 10 °C, resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio.

En cuanto a la viscosidad producida por cada una de las cepas, los niveles alcanzados de este parámetro en el alimento se presentan de menor a mayor en la Figura 6, con valores entre  $27.14 \pm 2.65$  -  $242.35 \pm 27.32$  cSt. Al ser el aumento de la viscosidad una de las principales características reportadas de deterioro en los productos jarabe de leche y base para helado, resulta importante señalar aquellas cepas que fueron capaces de producir una viscosidad 5 veces mayor al control ( $35.46 \pm 7.06$  cSt) con valores por arriba de los 175 cSt (Figura 6, cuadro rojo).

Las cepas que produjeron viscosidad alta fueron aisladas en un 40.63 % de producto deteriorado y 59.37 % de producto no deteriorado. Es significativo señalar que 45/46 cepas produjeron viscosidades por arriba del control a excepción de la cepa J16 que tuvo un comportamiento similar al del control ( $27.14 \pm 2.65$  cSt).

Se ha reportado en diversos estudios que cepas de *Leuconostoc* spp. están implicadas en procesos de deterioro en la industria alimentaria, como en el caso de la caña de azúcar, vegetales o el vino, debido a la formación de limo (Dimopoulou & Dols-Lafargue, 2021; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

Gran parte de las bacterias del género *Leuconostoc* tiene la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) los cuales no están adheridos de forma permanente a la superficie de la bacteria y durante su crecimiento se secretan a su entorno, lo que genera limo. Los EPS tienen la capacidad de unir agua, lo que da

como resultado una disminución de la fluidez o un aumento de la viscosidad de las soluciones en donde se encuentren, cuanto mayor sea la concentración, mayor será la viscosidad de la solución, sin dejar de lado características propias del EPS como su estructura, tamaño y rigidez (Nicolescu *et al.*, 2023).

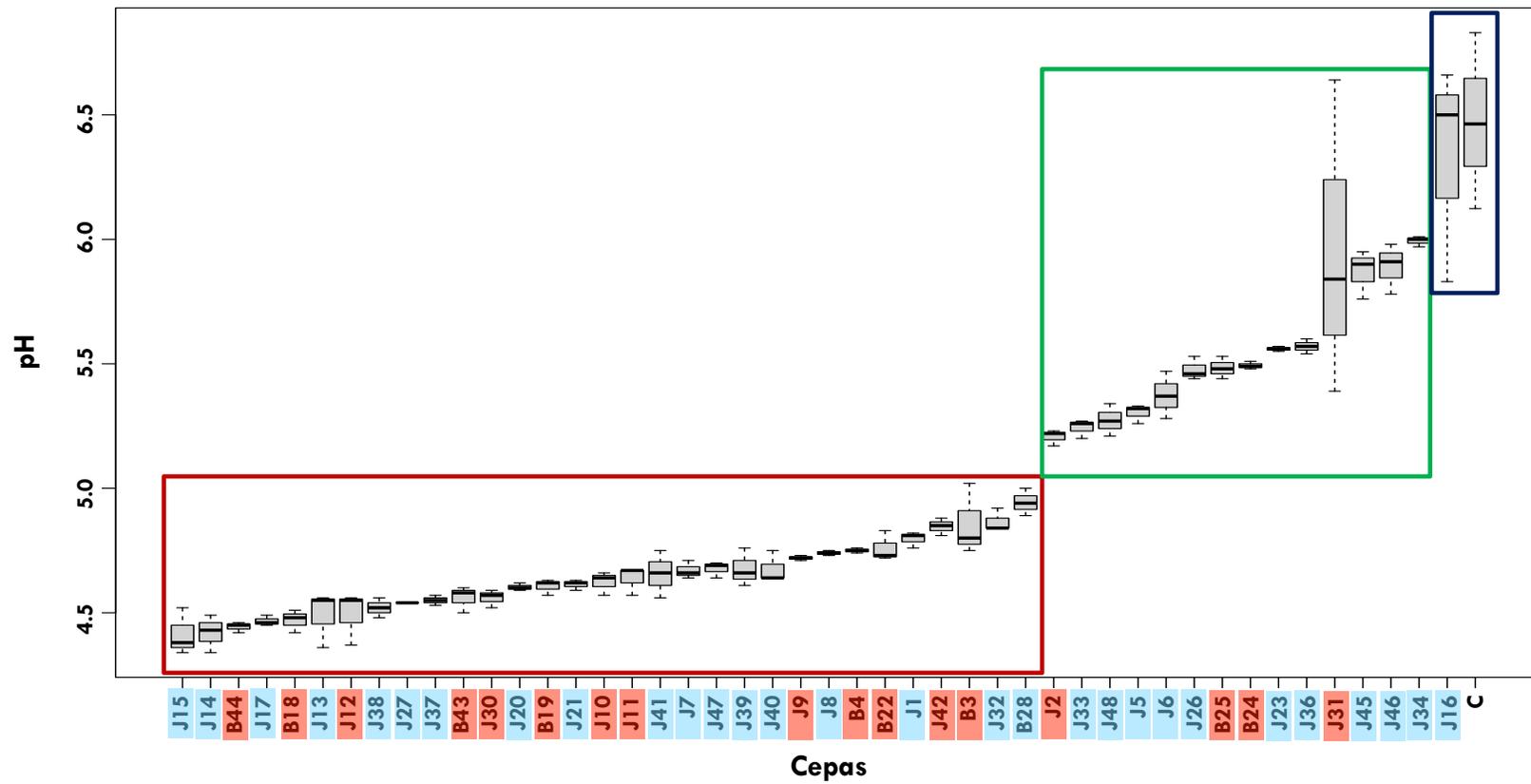
La industria alimentaria ha aprovechado la capacidad de las bacterias productoras de EPS para mejorar la reología, textura y sensación en la boca de algunos alimentos fermentados (Nieto-Arribas *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012). No obstante, para el caso de productos no fermentados, como los analizados en este estudio, esta capacidad de producir EPS (formación de limo) es considerada como un signo de deterioro (aumento viscosidad) y ocasiona rechazo por parte de los consumidores.

Si bien, es importante evaluar las características de deterioro de manera individual, resulta interesante poder analizar en conjunto todas estas y así identificar aquellas cepas que reproducen mejor el deterioro que se ha presentado en jarabe de leche y base para helado (elevado conteo bacteriano, aumento de viscosidad y disminución de pH).

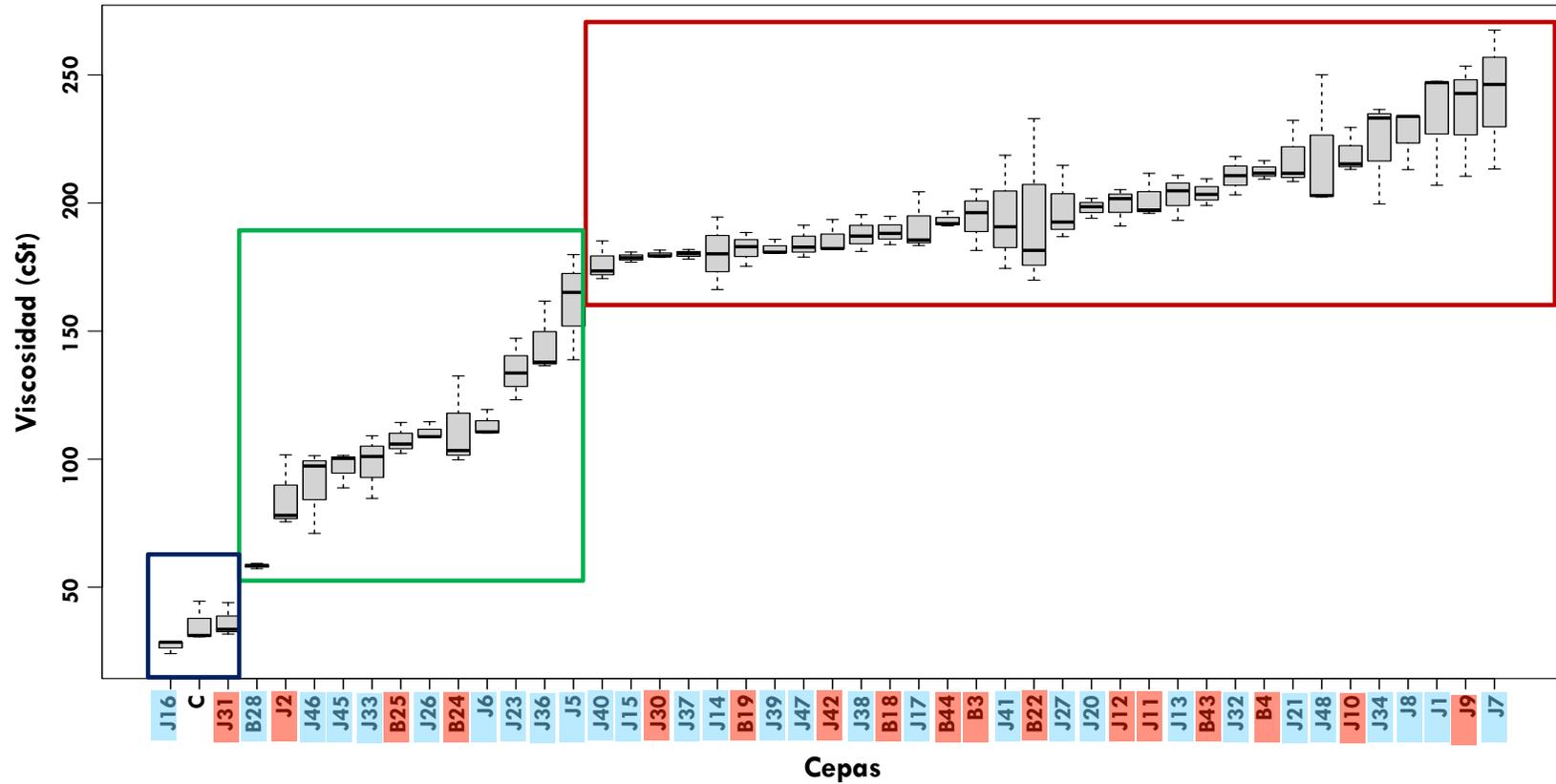
En la Figura 7 se muestra la caracterización de deterioro conjuntando todos los parámetros evaluados, en la cual se puede observar que todas las cepas a excepción de la J16 y el control (C) alcanzaron poblaciones por arriba de 7 log UFC/mL (eje y). Pese a que las poblaciones fueron muy similares, las evaluaciones de pH y viscosidad pudieron agrupar a las cepas que generaron características semejantes en el producto, estas agrupaciones se pueden visualizar en la Figura 7.

El círculo rojo agrupa aquellas cepas con viscosidad elevada (>175 cSt) y pH <5, en el círculo color verde aquellas con viscosidad intermedia (175- 50 cSt) y pH entre 5-6 y en el azul aquellas con viscosidad <50 cSt. El grupo que mejor reproduce el deterioro observado en los productos estudiados es el señalado en rojo, con un total de 31 cepas de las cuales el 41.94 % se aisló de producto deteriorado y el 58.06 % de producto no deteriorado. En tanto la cepa J16 asemejó mucho el comportamiento del control (viscosidad baja y pH >6).

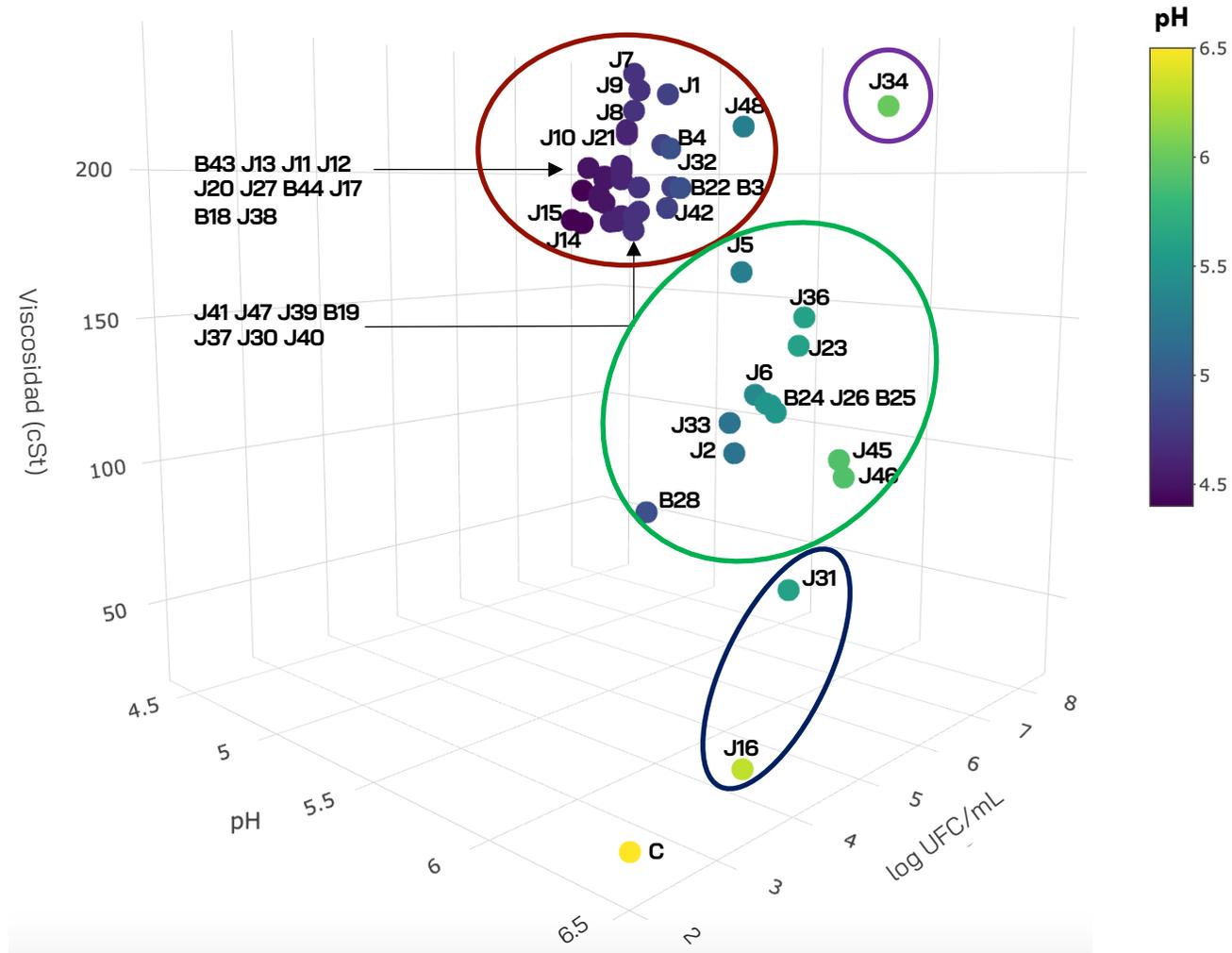
Por último, un comportamiento que es preciso hacer notar es el de las cepas J16 y J34, ambas alcanzaron un pH > 6 (6.3 y 6.0 según corresponda), similar al control. No obstante, la cepa J16 produjo una viscosidad baja (27.1 cSt), mientras que la cepa J34 una viscosidad alta (223.1 cSt). Es por esta razón que se considera significativo poder determinar la capacidad de deterioro evaluando diferentes parámetros y no solo uno, el cual pudiera darnos datos erróneos de lo que puede estar ocurriendo en el producto.



**Figura 5.** Valores de pH alcanzados en jarabe de leche inoculado con cepas de *Leuconostoc* spp. por 14 días a 10 °C. □ pH <5, □ pH 5-6, □ pH >6. Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■).



**Figura 6.** Viscosidad de jarabe de leche inoculado con cepas de *Leuconostoc* spp. por 14 días a 10 °C. □ viscosidad alta, □ viscosidad intermedia, □ viscosidad baja. Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■).



**Figura 7.** Caracterización de la capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc* spp. en jarabe de leche.

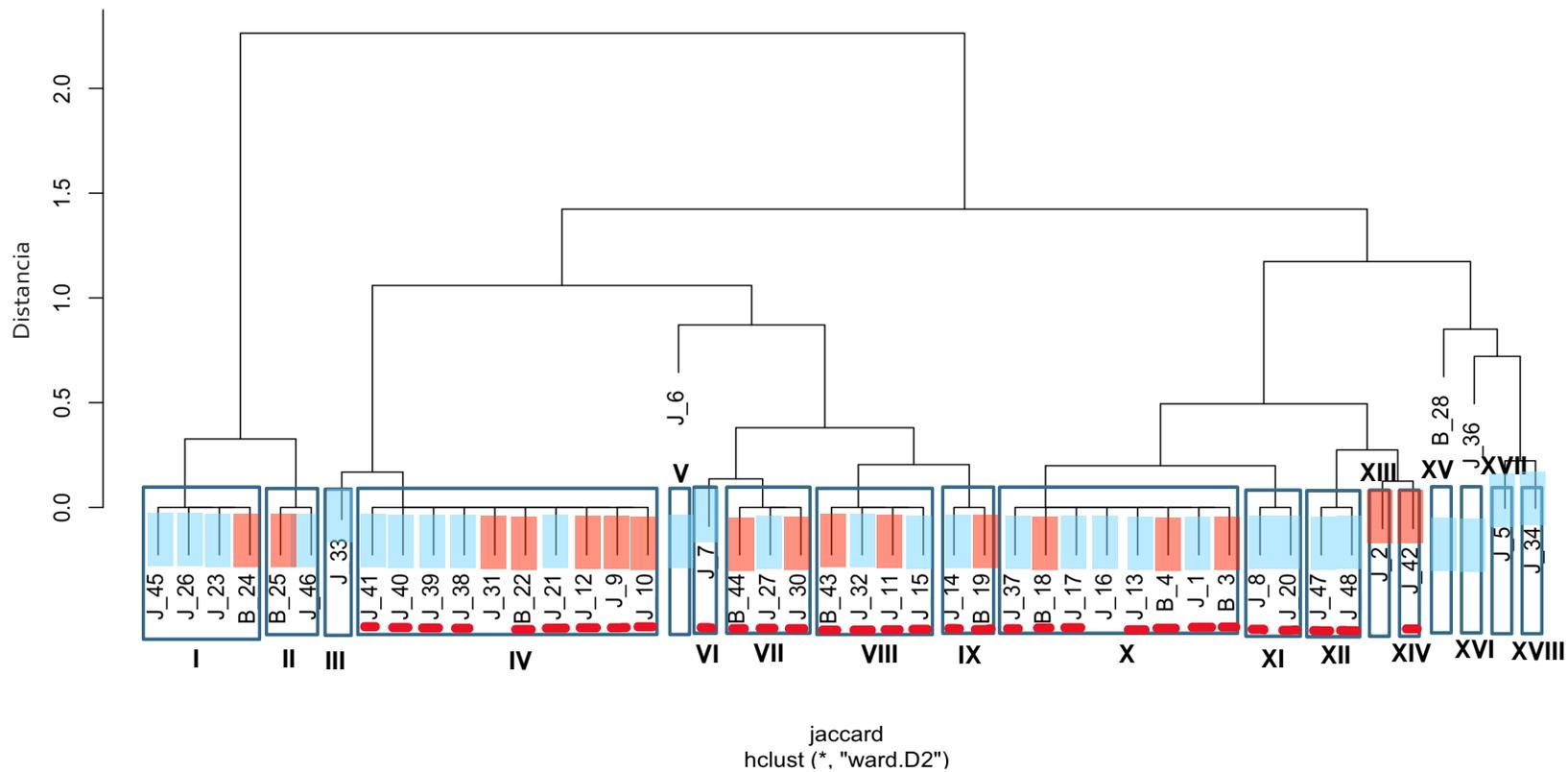
### **V.3 Caracterización genotípica mediante Amplificación Polimórfica Aleatorizada de ADN (RAPD)**

Con la finalidad de conocer la diversidad genética presente en las cepas de *Leuconostoc* spp., se realizó una caracterización mediante RAPD y se obtuvieron perfiles de bandas de cada una de las cepas evaluadas. Con ayuda del índice de Jaccard se obtuvo el grado de similitud entre cada uno de los perfiles y utilizando el método de Ward se realizó una agrupación jerárquica teniendo como resultado el dendograma mostrado en la Figura 8. El cual muestra a su derecha la distancia que hay entre cepas, distancia relacionada con el grado de similitud, esto es, entre menor distancia, mayor grado de similitud y, por el contrario, cuanto mayor distancia, menos similitud o mayor grado de disimilitud. Con base a lo anterior y considerando la mayor similitud, las cepas se agruparon en 18 clústeres, siendo los clústeres IV y X los que concentraron al mayor número de cepas (10 y 8 respectivamente), asimismo, no se observó tendencia de agrupación en cuanto al origen ya que un mismo clúster se conformó con cepas aisladas tanto de jarabe de leche como de base para helado, así como de producto deteriorado y no deteriorado, a excepción de algunos clústeres pequeños (<2 cepas).

Al mismo tiempo, se consideró valioso señalar en el dendograma aquellas cepas que en la caracterización deterioradora fueron de mayor interés (Figura 7, cepas en círculo rojo) y resultó interesante observar su distribución en el 50 % de clústeres (IV, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIV). El 100% de las cepas pertenecientes a los clústeres VI, VII, VIII, IX, XI, XII, XIV manifestaron elevada capacidad de deterioro, sin embargo, en los clústeres IV y X no sucedió lo mismo, ya que las cepas J31 y J16 pertenecientes a los clústeres IV y X respectivamente fueron de poco interés al mostrar una baja capacidad de deterioro.

El elevado número de clústeres formados dentro de un mismo género, así como la distribución de las cepas por su capacidad deterioradora evidencia la alta diversidad presente en las cepas estudiadas.

La técnica de RAPD-PCR se ha utilizado con frecuencia para evaluar la diversidad de bacterias, así como discriminar de manera sencilla y rápida diferentes especies (Kaur *et al.*, 2017). Su aplicación en el estudio de la diversidad en cepas de *Leuconostoc* spp., se ha empleado en una vasta variedad de alimentos como el queso manchego artesanal, queso Pecorino di Filiano, alimentos coreanos (rábano, almeja salada, pescado salado, pasta de soja, pulpo), incluido el famoso Kimchi (Bonomo & Salzano, 2013; Kaur *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 1997; Nieto-Arribas *et al.*, 2010). Todos estos estudios coinciden que dicha técnica resulta rápida y quizá una de las más fáciles y económicas de emplear en el estudio de la diversidad utilizando marcadores moleculares, no obstante, es importante poder complementar la información con otro tipo de pruebas. En este sentido, Pogačić *et al.* en 2011 evaluaron rasgos fenotípicos de cepas de *Leuconostoc* spp. estrechamente relacionadas genéticamente aisladas de queso fresco de oveja. Es decir, estudiaron de manera simultánea la diversidad genotípica (RAPD-PCR y PFGE) y fenotípica (API-50) de los aislados, demostrando que las cepas genéticamente relacionadas al 100% (pertenecientes a un mismo perfil RAPD o PFGE) no necesariamente manifestaban el mismo perfil fenotípico (Pogačić *et al.*, 2014). Estos resultados coinciden con lo encontrado en este estudio donde a pesar de que las cepas son del mismo género, compartiendo similitudes morfológicas y además perteneciendo a un mismo perfil RAPD, no todas comparten la misma capacidad de deterioro en el producto. Resultados similares ya se habían obtenido tiempo atrás cuando se estudió la diversidad de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de Kimchi mostrando que a pesar de las semejanzas morfológicas y fisiológicas existía una amplia variedad genética entre las cepas estudiadas (Kim *et al.*, 1997).



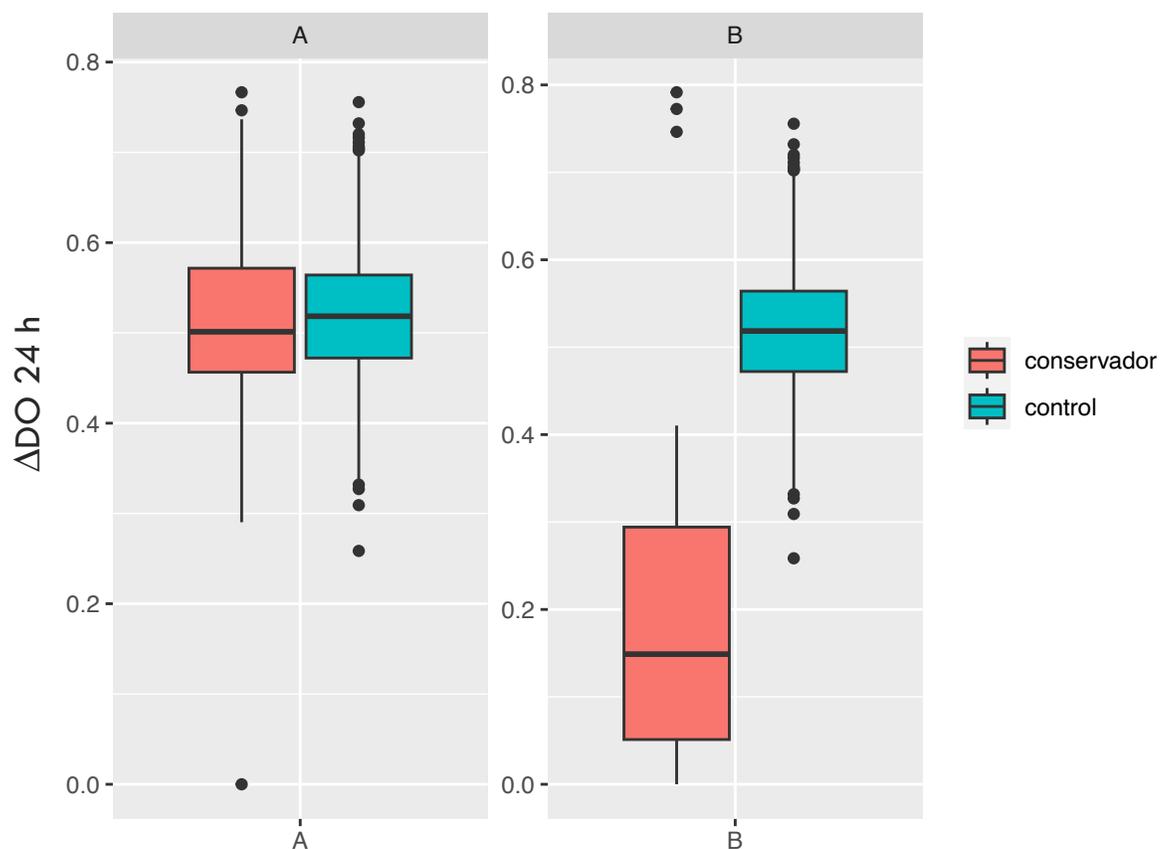
**Figura 8.** Clústeres formados por cepas de *Leuconostoc* spp. con base en el perfil de RADP. Cepas con mayor capacidad de deterioro (■). Origen de cepas: producto deteriorado (■), producto no deteriorado (■).

#### **V.4 Evaluación de conservadores frente a cepas de *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado.**

Los productos lácteos azucarados como el jarabe de leche y la base para helados por su composición son una fuente de energía para algún microorganismo que pueda llegar a ellos, favoreciendo su crecimiento y con esto promoviendo el deterioro de estos. Por esta razón la industria láctea, hace uso de conservadores (aditivos alimentarios) que incorpora a sus productos con el objetivo de extender su vida útil y protegiéndolos contra el deterioro causado por microorganismos (Sharif *et al.*, 2017; Silva & Lidon, 2016).

Los conservadores pueden ser de 2 tipos: naturales o sintéticos. Un ejemplo de los conservadores naturales son las bacteriocinas, como la nisina que tiene una eficacia bactericida comprobada contra bacterias Gram positivas, incluidas las BAL, patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus* así como bacterias formadoras de esporas (*Bacillus* y *Clostridium*). Por otro lado están los conservadores sintéticos como sulfitos, benzoatos, sorbatos y así como sus respectivos ácidos que han demostrado eficacia en gran número de bacterias (Müller-Auffermann *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018).

Al ser los conservadores un método de control de deterioro en productos lácteos, se evaluaron dos conservadores de naturaleza química diferente frente a cada una de las cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas: A) nisina (6 ppm) de origen natural con eficiencia contra bacterias Gram positivas como es el caso de *Leuconostoc* (Amiri *et al.*, 2021) y B) Lactiplus (0.5 %) de amplio espectro, que tiene como base el ácido propiónico (Nutryplus, 2018). De manera in vitro las cepas se hicieron crecer en caldo MRS adicionado con cada uno de los conservadores evaluados y se midió la densidad óptica a 600 nm (DO) al inicio y término de la evaluación. Se estimó el incremento en la DO de cada cepa en cada tratamiento a las 24 h ( $\Delta$ DO) y se muestran en la Figura 10. Después de las 24 h de incubación no se observaron cambios significativos en los niveles de DO.



**Figura 9.** Incremento de la DO de las cepas en MRS conteniendo conservadores: **A)** nisina y **B)** Lactiplus, en contraste con el control sin conservador.

En los diagramas de caja y bigotes se aprecia la distribución de los datos de incremento de DO de las cepas en presencia y ausencia (control) de cada uno de los conservadores. En la Figura 9 A se puede observar que el comportamiento de las poblaciones microbianas en medio con y sin nisina (control) fue muy similar. Para nisina las  $\Delta DO$  fueron de 0.29 - 0.76 con promedio de 0.51, mientras que para el control fueron de 0.25 - 0.75, con promedio 0.52, no encontrando diferencias significativas al emplear nisina. Por otra parte, en la evaluación del conservador Lactiplus (Figura 9 B) se observa un comportamiento distinto en las poblaciones microbianas en medio con y sin conservador, contrario a lo ocurrido con nisina. Las  $\Delta DO$  alcanzadas en presencia de Lactiplus fueron 0 - 0.41, con una media de 0.18,  $\Delta DO$  bajas con respecto a las del control (0.25 - 0.75, media 0.52), habiendo una diferencia significativa en presencia y ausencia del conservador Lactiplus. Las

cepas en presencia de este mostraron una inhibición en su crecimiento, no obstante, cuando este se encuentra ausente en el medio (control), las cepas tuvieron un crecimiento más acentuado. *In vitro*, Lactiplus manifiesta un gran potencial para poder controlar el crecimiento de las cepas de *Leuconostoc* spp. evaluadas. A excepción de la cepa B44 (datos atípicos en la gráfica) que pudo crecer de manera indiferente en presencia o ausencia del conservador con una  $\Delta DO$  media de  $0.77 \pm 0.02$ . Resulta interesante el comportamiento de esta cepa, ya que ninguno de los dos conservadores evaluados pudo controlar su crecimiento, asimismo forma parte de las cepas con elevada capacidad deterioradora, dato de mucha relevancia en este estudio.

El uso de aditivos como los conservadores es una solución prometedora para alargar la vida útil de los productos lácteos, ya que una contaminación microbiana puede ocurrir en cualquier parte de la cadena alimentaria volviéndose un problema de seguridad y calidad de los alimentos. En diversos estudios la nisina ha sido catalogada como un conservador natural eficiente, especialmente para bacterias Gram positivas, su aplicación en alimentos se ha extendido ya que la FDA la ha reconocido como generalmente segura (estatus GRAS, por sus siglas en inglés). Su efectividad se basa en la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, conduciendo a la formación de poros y la posteriormente la muerte de la bacteria (Ahmad *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2016).

La nisina se ha probado en productos lácteos pasteurizados como leches evaporadas y saborizadas, crema cuajada o postres refrigerados demostrando efecto antimicrobiano sobre bacterias contaminantes post-proceso, como es el caso de *L. monocytogenes* (Galvez *et al.*, 2008). Pese a que tiene gran aceptación, es sabido que en ciertos productos lácteos su efectividad se ve limitada, en particular en aquellos productos con pH neutro elaborados con leche entera (Gharsallaoui *et al.*, 2016). Esto es debido a que la nisina tiene una máxima estabilidad y solubilidad a pH 3, por tanto, a pH neutros ( $\geq$  pH 6) esta se vuelve inestable y poco eficiente. Esta podría ser la razón por la que en productos lácteos no fermentados como el

jarabe de leche y base para helados que se caracterizan por tener pH casi neutro >6 la eficacia de la nisina se vea reducida, favoreciendo el desarrollo de bacterias deterioradoras (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2020). De igual manera, se podría sugerir que el factor pH influyó en la solubilidad y estabilidad de la nisina al ser evaluada contra las cepas de *Leuconostoc* spp. debido a que el pH del medio donde se llevaron a cabo las evaluaciones fue de  $5.7 \pm 0.1$ . También podría pensarse que la producción de los polímeros alrededor de las células podría limitar el contacto de la nisina con las células.

Otro factor que puede limitar el uso y efectividad de la nisina en los alimentos es la variabilidad natural dentro de una especie determinada a la tolerancia a la nisina y la adquisición de resistencia a la misma como consecuencia a la repetida exposición. Se ha descubierto en algunas cepas de *L. monocytogenes* una alta tolerancia natural a la nisina y dicha tolerancia podría estar asociada con mutaciones en el sistema glutamato descarboxilasa (Szendy *et al.*, 2019). Así mismo, una previa exposición a este conservador puede seleccionar mutantes resistentes. De la misma manera que el pH causa la pérdida de estabilidad y eficacia de la nisina, esta inestabilidad en los productos lácteos podría originar la selección de bacterias con capacidad de desarrollar resistencia a la nisina (Ibarra-Sánchez *et al.*, 2020).

Por otro lado, el ácido propiónico, componente principal del conservador Lactiplus es un compuesto químico de tres carbonos, que al igual que la nisina, es generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA. Además, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), al ser una sustancia que de manera natural se encuentra en la dieta normal, su incorporación en los alimentos no causaría un problema de seguridad, siempre y cuando se respeten las concentraciones máximas permitidas en la regulación (12.5 ppm) (EFSA, 2014; Gonzalez-Garcia *et al.*, 2017).

El ácido propiónico se obtiene principalmente por vía petroquímica, aunque actualmente existe un gran interés por su síntesis vía biotecnológica. Su aplicación en diversas industrias es debido a su actividad antimicrobiana para un amplio espectro de microorganismos, empleándolo como conservador en alimentos como productos lácteos, de panadería e incluso en piensos para animales. El ácido propiónico es eficiente contra aquellos microorganismos que lo metabolizan, por acumulación en las células y bloqueo de las vías metabólicas por la inhibición de las enzimas. También puede reducir el pH intracelular e inhibir el crecimiento microbiano como resultado de la acumulación de aniones, esto dependiendo de la concentración (Ranaei *et al.*, 2020).

Diferentes autores han demostrado la efectividad del ácido propiónico, tal como lo hizo Wang *et al.* (2014) al evaluar el efecto de este conservador sobre *Staphylococcus aureus*. Ellos reportaron que el ácido propiónico redujo de manera notable el pH intracelular de la bacteria suprimiendo de manera eficiente su crecimiento y también presentó actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Candida albicans*. En otro estudio, se investigó la eficacia antimicrobiana de fermentados que contenían ácido propiónico como componente principal contra patógenos transmitidos por alimentos, probando que los fermentados tenían una fuerte y específica actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Antone *et al.*, 2023). Debido a la fuerte actividad antimicrobiana que el ácido propiónico tiene y que ya se ha demostrado sobremano, se le podría atribuir el efecto que tuvo el conservador Lactiplus controlando el crecimiento de las cepas de *Leuconostoc* spp. en este estudio. Además, cabe señalar que se ha demostrado su estabilidad a pH neutros.

### **V.5 Resistencia térmica de cepas *Leuconostoc* spp. deterioradoras de jarabe de leche y base para helado.**

La leche y los productos lácteos son alimentos ricos en nutrientes para los humanos, contienen carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales. Sin embargo, por sus propiedades nutricionales, son una matriz muy favorable para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos deterioradores y patógenos. Esto fue un problema durante mucho tiempo, hasta que por casualidad se descubrió que el calentamiento de la leche, vino, productos lácteos y diversos alimentos podía inactivar a las bacterias que estuvieran presentes en ellos, mejorando con esto la vida útil y la inocuidad (Lindsay *et al.*, 2021). Actualmente se sabe que la pasteurización de la leche y los productos lácteos previenen las enfermedades transmitidas por los alimentos. Pero, una pequeña falla en la aplicación adecuada de un tratamiento térmico o una recontaminación posterior puede traer como resultado problemas de deterioro, brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos e incluso el retiro de productos del mercado (Costard *et al.*, 2017).

El objetivo del tratamiento térmico, como la pasteurización, es la inactivación de microorganismos, mejorando con ello la inocuidad y calidad de los productos. El proceso implica calentar la leche, productos lácteos o cualquier otro producto a una temperatura constante durante un tiempo determinado, por ejemplo, para la pasteurización lenta se necesitan 63 °C durante 30 minutos, mientras que la rápida necesita al menos 72 °C durante 15 s (Boor *et al.*, 2017). Pese a la utilización de altas temperaturas, existen bacterias termotolerantes, que son capaces de sobrevivir a la pasteurización, ya sea en estado vegetativo o de esporas. Las bacterias que sobreviven a la pasteurización comercial frecuentemente son Gram positivas, no formadoras de esporas como es el caso de las bacterias deterioradoras (por ejemplo: lactobacilli, *Streptococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*), así como bacterias formadoras de esporas, dentro de las cuales se encuentran cepas de *Bacillus*, *Clostridium*, *Paenibacillus*, etc (Murphy *et al.*, 2016).

Hoy en día, existen técnicas, métodos y estimaciones que proporcionan información acerca de la resistencia que tienen las bacterias al calor. Tal es el caso del valor D, el cual se implementó debido a la necesidad de una medida simple de cuán resistentes son los microorganismos a los procesos de calentamiento.

El valor D se define como el tiempo necesario para reducir el 90 % de la población (1 log de unidades formadoras de colonias (UFC)) a un nivel de temperatura específico. Es así que el valor D depende del tipo de bacteria y cepa probada, la fase de desarrollo en que se encuentre, la temperatura aplicada, la matriz (leche líquida, productos lácteos concentrados) y el método de procesamiento, entre otros factores (Lindsay *et al.*, 2021).

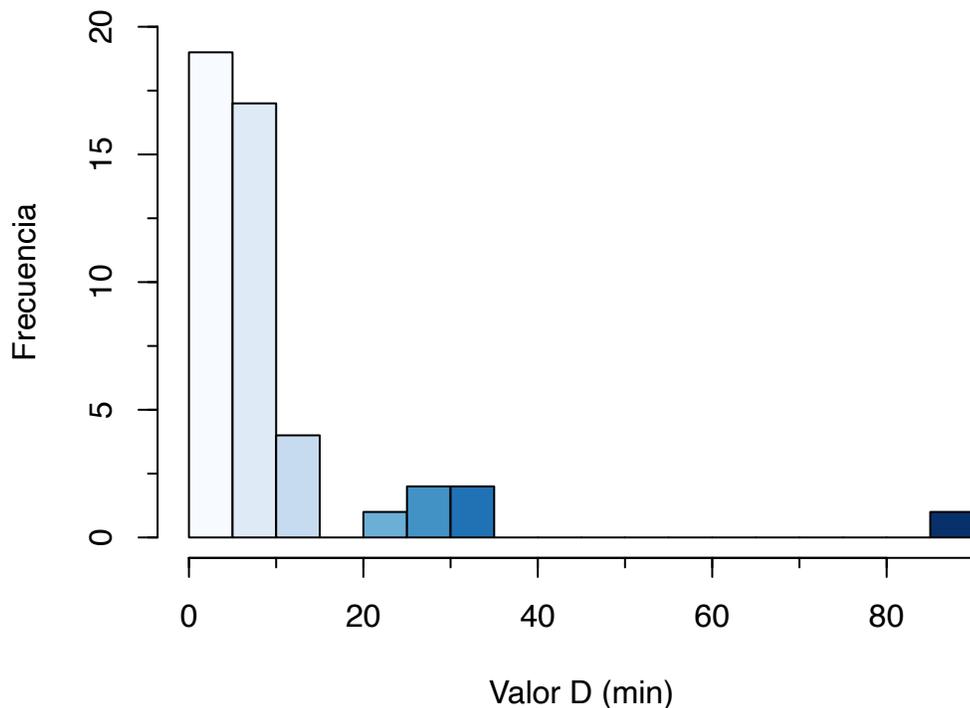
Existen modelos matemáticos que se ajustan a datos generados en un entorno controlado como el laboratorio, brindando información que ayuda a conocer el comportamiento específico de los microorganismos y poder predecir bajo determinadas condiciones, algunos ejemplos de modelos son: Gompertz, Logistic y Baranyi y Roberts (Buss da Silva *et al.*, 2017). Desde 1994 el modelo de crecimiento de Baranyi y Roberts ha sido uno de los más utilizados, al contemplar parámetros que no se habían tomado en cuenta en otros modelos como el tiempo de latencia, mostrando mejor ajuste en el modelamiento de datos. Este modelo relaciona la concentración de células viables con el tiempo en una curva primaria, para posteriormente estimar parámetros cinéticos como tasa de crecimiento/inactivación ( $\mu_{max}$ ), tiempo de adaptación o latencia (lag) y densidad de población máxima ( $y_0$ ,  $y_{End}$ ). El parámetro principal,  $\mu_{max}$  es la tasa máxima potencial del modelo, que puede ser negativa para la muerte, "lag" determina el parámetro de latencia.  $y_0$  es el punto inicial de la curva sigmoide y el parámetro  $y_{End}$  es la asíntota superior de la curva sigmoide (o asíntota inferior si la curva disminuye) (Baranyi & Roberts, 1994). Mediante este modelo y con ayuda del parámetro cinético  $\mu_{max}$  se puede determinar el valor D de un microorganismo, obteniendo el inverso de  $\mu_{max}$  ( $-1/\mu_{max}$ ), brindando con ello información de cuán resistente es un microorganismo.

El tratamiento térmico ha mostrado ser un método eficiente para inactivar una diversidad de microorganismos. Por ello, se evaluó la resistencia térmica de las cepas aisladas de *Leuconostoc* spp. a 57 °C durante 15 min. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa DMFit 3.5 (József Baranyi, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, UK) para obtener el valor D (Tabla 5) a través del parámetro cinético  $\mu_{max}$ . Para los datos de las cepas que la herramienta no pudo calcular el parámetro  $\mu_{max}$ , el valor D se calculó utilizando la pendiente de la recta al graficar al menos 3 puntos de los datos obtenidos.

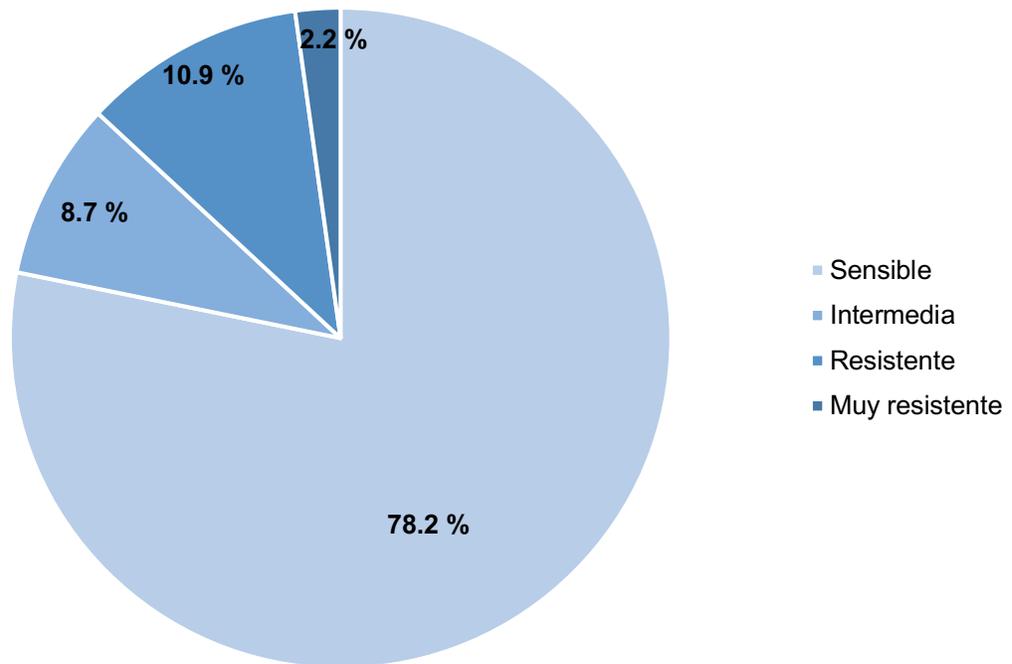
**Tabla 5.** Valor  $D_{57}$  de *Leuconostoc* spp. en jarabe de leche.

Cepa	Valor D	Cepa	Valor D
J42	2.38	J12	8.67
J40	2.78	J31	8.88
J41	2.87	J9	9.29
J33	2.90	J10	9.39
J13	3.10	J26	9.71
J27	3.13	J5	14.02
J30	3.18	J14	14.20
J47	3.33	J6	14.60
J38	3.69	J16	20.29
J39	4.21	J23	27.47
J7	4.57	J34	28.17
J32	4.70	J15	30.47
J37	4.78	J36	31.59
J21	4.81	B22	3.42
J46	5.16	B3	3.44
J8	5.45	B25	3.57
J45	5.55	B44	3.67
J48	5.90	B19	4.66
J20	6.36	B4	5.40
J1	6.60	B18	6.42
J11	6.62	B43	7.12
J2	8.11	B24	13.79
J17	8.33	B28	85.76

El valor D (tiempo de reducción decimal) obtenido de las cepas evaluadas fue diverso, teniendo un valor mínimo de 2.38 (cepa J42) y un máximo de 85.76 (cepa B28). La mayoría de las cepas (n=36) tuvieron valores D en el rango de 2.38 – 10.00, 4 cepas en el rango de 10.00 – 20.00, 5 cepas ente 20.00 – 40.00 y por último 1 cepas con valores D por arriba de 40.00 (Figura 10). En este sentido, y considerando los rangos de valor D, las cepas se podrían clasificar en sensibles (2.38 – 10.00), intermedias (10.00 – 20.00), resistentes (20.00 – 40.00) y muy resistentes (> 40.00), en cuanto a su tolerancia al tratamiento térmico evaluado. Así pues, en la Figura 11 se observa la termotolerancia de las cepas de acuerdo con la clasificación antes mencionada, el 78.2 % fue sensible, 8.7 % intermedia, 10.9 % resistentes y 2.2 % muy resistentes.

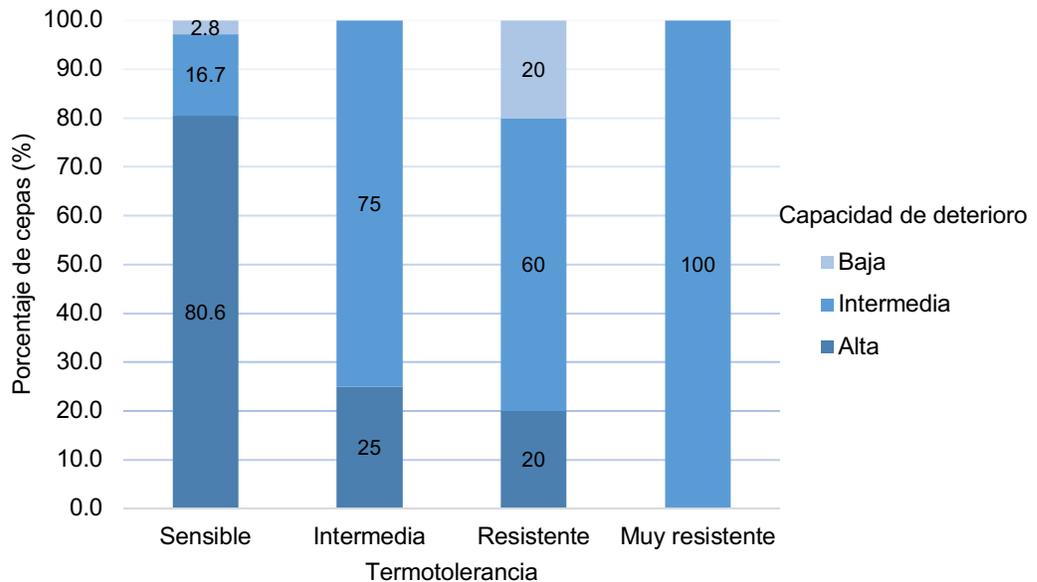


**Figura 10.** Histograma de valor D<sub>57</sub> de cepas de *Leuconostoc* spp.



**Figura 11.** Porcentaje de cepas de *Leuconostoc* spp. termotolerantes (57 °C).

Además, para conjuntar los resultados obtenidos, en la Figura 12 se muestra la capacidad de deterioro de las cepas de *Leuconostoc* spp. con respecto a la clasificación de termotolerancia ya mencionada (Figura 11). En la cual se observa que la mayoría de las cepas sensibles al tratamiento térmico tienen una capacidad de deterioro alta, información de relevancia para el control de estas. Sin embargo, las cepas con termotolerancia resistente y muy resistente en su mayoría tienen una capacidad de deterioro intermedia y alta (J15, J23, J34, J36, B28). Es interesante resaltar que estas cepas con elevada termotolerancia y capacidad deterioradora fueron aisladas de producto no deteriorado. Además, pese a que pertenecen a perfiles genéticos diferentes (VIII, I, XVIII, XVI, XV), algunos perfiles se encuentran muy cercanos entre sí (XV, XVI y XVIII), lo que podría explicar su semejanza. No obstante, aunque presentaron tolerancia al calor, su crecimiento se vio disminuido cuando se hicieron crecer en presencia del conservador Lactiplus, por lo que se podría proponer una combinación de métodos para hacer eficiente el control de dichas bacterias.



**Figura 12.** Porcentajes de capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc* spp. con respecto a su termotolerancia.

La pasteurización es una tecnología que ha permitido que los productos lácteos se consuman de forma segura. Sin embargo, se ha demostrado que los microorganismos responden de diferentes maneras al calor debido a una variedad de factores. Por ejemplo, las BAL han desarrollado mecanismos de defensa como la adaptación térmica cuando se encuentran en una situación de estrés subletal, induciendo la producción de proteínas de estrés general mejorando con esto su robustez para situaciones futuras. Así mismo, cuando se han expuesto con anterioridad a temperaturas elevadas, estas se adaptan y cuando nuevamente se exponen a las mismas temperaturas o incluso más elevadas estas muestran una mayor resistencia térmica (D'Angelo *et al.*, 2017; De Angelis & Gobbetti, 2011).

Otro factor relevante en la resistencia al calor de los microorganismos es la matriz alimentaria en donde se encuentran, por ejemplo, el contenido de grasa que tienen los productos lácteos, puede tener un efecto protector para las bacterias cuando se aplica un tratamiento térmico (Yang *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Osaili *et al.* (2009), evaluaron la resistencia térmica de *Cronobacter sakazakii* en diferentes leches y fórmulas lácteas. Encontraron que a 52 y 58 °C, los valores D fueron significativamente mayores en la leche entera (22.10 y 0.68 min) que en la leche baja en grasa (15.87 y 0.62 min) o desnatada (15.30 y 0.51 min). Confirmando que el contenido de grasa si influyen en la supervivencia de la bacteria ante este factor.

Al igual que el contenido de grasas, la presencia de sólidos totales en la matriz alimentaria influye en la resistencia térmica. Tal como sucedió con el patógeno *Salmonella Typhimurium* NZRM 4220, que a 61.5 °C en leche líquida mostró una reducción > 6.9 log en 15 s. No obstante, cuando la leche se concentró, los valores D a 57 °C aumentaron de 1.4 min al 10 % de sólidos totales a 26.6 min al 51 % de sólidos totales (Lindsay *et al.*, 2021).

El estudio de los microorganismos que comprometen la calidad de los productos lácteos como *Leuconostoc* spp. requiere que se comprendan todos y cada uno de los factores involucrados: la matriz alimentaria (jarabe de leche y base para helado), capacidad de deterioro del microorganismo, diversidad genética presente, tolerancia a calor y conservadores, y advertir como se relacionan entre sí, para obtener datos lo más cercano a lo que sucede en el proceso y tener como resultado estrategias eficientes de control.

## VI. CONCLUSIONES

La mayoría de las cepas causantes de deterioro en jarabe de leche y base para helado pertenecen al género *Leuconostoc*.

La sola presencia de cepas deterioradoras no implica necesariamente daño al producto. Se requiere condiciones que permitan su desarrollo hasta alcanzar concentraciones compatibles con los signos de deterioro.

El deterioro producido por las cepas de *Leuconostoc* spp. se evidenció por un conteo bacteriano elevado, disminución en el pH y aumento de viscosidad en jarabe de leche.

Se demostró una amplia diversidad genética entre las cepas aisladas de *Leuconostoc* spp. Además, se observaron perfiles RAPD exclusivos de cepas aisladas de producto deteriorado y no deteriorado.

Los genotipos I, VII, VIII, X, XVI, XVI y XVIII que agrupan a las cepas con mayor capacidad de tolerancia al calor y los conservadores, sería relevante identificar su origen en el proceso.

La utilización de Lactiplus en conjunto con la aplicación del tratamiento térmico permite el control del crecimiento de las cepas de *Leuconostoc* spp., por lo que la combinación de estos factores es una estrategia de control prometedora para los productores.

## VII. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS

Estudiar la capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc* spp. en base para helado.

Evaluar la tolerancia de cepas de *Leuconostoc* spp. a desinfectantes como una estrategia de control dirigido al proceso de producción del jarabe de leche y base para helado.

Realizar ensayos de interacción entre las cepas de *Leuconostoc* spp. y lactobacilli en cuanto a capacidad de deterioro, tolerancia a calor y conservadores, para evidenciar antagonismo o sinergismo que pueda presentarse en la matriz alimentaria.

Efectuar un análisis de secuenciación de genoma de las cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de jarabe de leche y base para helados para complementar la información obtenida de la diversidad genética.

Este trabajo brinda información de utilidad para futuros estudios en jarabe de leche y base para helado, ya que existen escasos reportes de deterioro asociado a *Leuconostoc* en estas matrices alimentarias.

## VIII. REFERENCIAS

- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016>
- Amiri, S., Moghanjoughi, Z. M., Bari, M. R., & Khaneghah, A. M. (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry: An overview of current and future applications. *Italian Journal of Food Science*, 33(SP1), 55–68. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33iSP1.2045>
- Amit, S. K., Uddin, Md. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Antone, U., Ciprovica, I., Zolovs, M., Scerbaka, R., & Liepins, J. (2023). Propionic acid fermentation—Study of substrates, strains, and antimicrobial properties. *Fermentation*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010026>
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K., & Saito, T. (2008). Microbial community analysis of food. Spoilage bacteria in commercial custard creams using culture. Dependent and independent methods. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2938–2946. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0677>
- Athayde, D. R., Flores, D. R. M., Silva, J. S., Silva, M. S., Genro, A. L. G., Wagner, R., Campagnol, P. C. B., Menezes, C. R., & Cichoski, A. J. (2018). Characteristics and use of electrolyzed water in food industries. *International Food Research Journal*, 25(1), 11–16.
- Ballester, E., Ribes, S., Barat, J. M., & Fuentes, A. (2022). Spoilage yeasts in fermented vegetables: Conventional and novel control strategies. *European Food Research and Technology*, 248(2), 315–328. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03888-7>

- Bancalari, E., Alinovi, M., Bottari, B., Caligiani, A., Mucchetti, G., & Gatti, M. (2020). Ability of a wild *Weissella* strain to modify viscosity of fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3086. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03086>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, *23*(3–4), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, *29*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Björkroth, J., Dicks, L. M. T., Endo, A., & H. Holzapfel, W. (2014). The genus *Leuconostoc*. In W. H. Holzapfel & B. J. B. Wood (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (1a ed., pp. 391–404). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch23>
- Bonomo, M. G., & Salzano, G. (2013). Genotypic and technological diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strains for use as adjunct starter cultures in Pecorino di Filiano cheese. *International Journal of Dairy Technology*, *66*(3), 402–409. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12040>
- Boor, K. J., Wiedmann, M., Murphy, S., & Alcaine, S. (2017). A 100-year review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 9933–9951. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>
- Buss da Silva, N., Baranyi, J., Carciofi, B. A. M., & Ellouze, M. (2017). From culture-medium-based models to applications to food: Predicting the growth of *B. cereus* in reconstituted infant formulae. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01799>
- Chen, B.-K., & Wang, C.-K. (2022). Electrolyzed water and its pharmacological activities: A mini-review. *Molecules*, *27*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/molecules27041222>

- Chen, S., Liu, S., Ma, J., Xu, X., & Wang, H. (2022). Evaluation of the spoilage heterogeneity of meat-borne *Leuconostoc mesenteroides* by metabonomics and in-situ analysis. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 156, 111365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111365>
- Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., & Zagmutt, F. J. (2017). Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 23(6), 957–964. <https://doi.org/10.3201/eid2306.151603>
- Cousin, F. J., Le Guellec, R., Chuat, V., Dalmasso, M., Laplace, J.-M., & Cretenet, M. (2019). Multiplex PCR for rapid identification of major lactic acid bacteria genera in cider and other fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.004>
- Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8598–8606. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11658>
- D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., & Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. *Food Microbiology*, 66, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.001>
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Lactic acid bacteria | *Lactobacillus* spp.: General characteristics. En *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 78–90). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00259-4>
- De Oliveira Mota, J., Boué, G., Prévost, H., Maillet, A., Jaffres, E., Maignien, T., Arnich, N., Sanaa, M., & Federighi, M. (2021). Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of the research and guidelines. *Food Control*, 130, 108283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108283>

- Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: Sources, structures, and properties. *Polysaccharides*, 2(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>
- Dijksterhuis, J. (2017). The fungal spore and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 17, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.006>
- Dimopoulou, M., & Dols-Lafargue, M. (2021). Exopolysaccharides producing lactic acid bacteria in wine and other fermented beverages: For better or for worse? *Foods*, 10(9), 2204. <https://doi.org/10.3390/foods10092204>
- Douglas, A., Barr, S., Reddy, S., & Summerbell, C. D. (2019). A critical review of the role of milk and other dairy products in the development of obesity in children and adolescents. *Nutrition Research Reviews*, 32(1), 106–127. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000227>
- Dousset, X., Jaffrès, E., & Zagorec, M. (2016). Spoilage: Bacterial spoilage. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 106–112). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00649-8>
- Early, R. (2012). Dairy products and milk-based food ingredients. En D. Baines & R. Seal (Eds.), *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings* (pp. 417–445). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857095725.2.417>
- EFSA. (2014). Scientific opinion on the re-evaluation of propionic acid (E 280), sodium propionate (E 281), calcium propionate (E 282) and potassium propionate (E 283) as food additives. *EFSA Journal*, 12(7), 3779. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3779>
- EMR. (2023). *Mercado de helados en México, tamaño, informe 2023-2028*. Claight Corporation (Expert Market Research). <https://www.informesdeexpertos.com/informes/mercado-de-helados-en-mexico>

- Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (Eds.). (2016). Spoilage of milk and milk products. En *Food Microbiology: Principles into Practice* (1a ed., pp. 307–336). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch19>
- Espinoza-Arellano, J. de J., Fabela-Hernández, A. M., López-Chavarría, S., & Martínez-Gómez, F. (2019). Impact of imports of powdered milk and dairy byproducts on the producer price of cow milk in Mexico. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 16(1), 123–139.
- FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. *Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. Roma., 198.
- FAO. (2020). Dairy Market Review—Emerging trends and outlook, December 2020. FAO. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CB2322EN/>
- FAO. (2023a). Dairy Market Review – Overview of global dairy market and policy developments in 2022. *Rome*.
- FAO. (2012). Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. *Roma*, 42.
- FAO. (2023b). Food loss and waste database. Technical platform on the measurement and reduction of food loss and waste. Food and agriculture organization of the United Nations. FoodLossWaste. <https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en>
- Galvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E., & Omar, N. B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 125–152. <https://doi.org/10.1080/07388550802107202>
- Gaona-Pineda, E. B., Martínez-Tapia, B., Arango-Angarita, A., Valenzuela-Bravo, D., Gómez-Acosta, L. M., Shamah-Levy, T., & Rodríguez-Ramírez, S. (2018). Consumo de grupos de alimentos y factores sociodemográficos en población mexicana. *Salud Pública de México*, 60(3, may-jun), Article 3, may-jun. <https://doi.org/10.21149/8803>

- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: Part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262–1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., & Marcellin, E. (2017). Microbial propionic acid production. *Fermentation*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/fermentation3020021>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467–494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Holt, null, & Cote, null. (1998). Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic DNA protocol. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3096–3098. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.3096-3098.1998>
- Huertas, J. R., Rodríguez Lara, A., González Acevedo, O., & Mesa-García, M. D. (2019). Milk and dairy products as vehicle for calcium and vitamin D: role of calcium enriched milks. *Nutricion Hospitalaria*, 36(4), 962–973. <https://doi.org/10.20960/nh.02570>
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., & Karam, L. (2020). Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2041–2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>
- IDFA. (2022). Ice cream sales & trends. International Dairy Foods Association. <https://www.idfa.org/news/ice-cream-sales-trends>
- INEGI. (2021). Banco de Información Económica. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/>

- Kaur, J., Lee, S., Park, Y.-S., & Sharma, A. (2017). RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT*, 77, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.078>
- Kawasaki, S., Ozawa, K., Mori, T., Yamamoto, A., Ito, M., Ohkuma, M., Sakamoto, M., & Matsutani, M. (2023). Symbiosis of carpenter bees with uncharacterized lactic acid bacteria showing NAD auxotrophy. *Microbiology Spectrum*, 11(4), e00782-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00782-23>
- Kim, E.-K., Ryu, C.-S., So, M.-H., & Kim, Y.-B. (1997). Studies on the genetic diversity using RAPD in *Leuconostoc* sp. Isolated from kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 29(5), 1063–1066.
- König, H., & Fröhlich, J. (2017). Lactic acid bacteria. En H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 3–41). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1)
- Kumar, A., Kumar, S., Puniya, M., & Malik, R. (2015). Fermented milk and dairy products: An overview. En *Fermented Milk and Dairy Products*. CRC Press.
- Kumari. (2014). Randomly amplified polymorphic DNA-A brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(1), 6–13. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2014.6.13>
- Lindsay, D., Robertson, R., Fraser, R., Engstrom, S., & Jordan, K. (2021). Heat induced inactivation of microorganisms in milk and dairy products. *International Dairy Journal*, 121, 105096. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105096>
- López-Gálvez, F., & Gil, M. I. (2020). La importancia del agua en la industria de alimentos vegetales. *Arbor*, 196(795), Article 795. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1011>

- Macián, M. c., Chenoll, E., & Aznar, R. (2004). Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 384–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02317.x>
- Mende, S., Rohm, H., & Jaros, D. (2022). Lactic acid bacteria: Exopolysaccharides. En P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 160–167). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22982-X>
- Menegaro, A., Flores, A. F., Simer, P., Silva, F. I., Sbardelotto, P. R. R., & Pinto, E. P. (2016). Sanitizantes: Concentrações e aplicabilidade na indústria de alimentos. *Scientia Agraria Paranaensis*, 15(2), 171–174. <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n2p171-174>
- Moschonas, G., Lianou, A., Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. Z. (2021). Spoilage potential of *Bacillus subtilis* in a neutral-pH dairy dessert. *Food Microbiology*, 95, 103715. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103715>
- Müller-Auffermann, K., Grijalva, F., Jacob, F., & Hutzler, M. (2015). Nisin and its usage in breweries: A review and discussion. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 309–319. <https://doi.org/10.1002/jib.233>
- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128–10149. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>
- Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Buruleanu, C. L., Popescu, E. C., Stanescu, S. G., Georgescu, A. A., & Toma, S. M. (2023). Biopolymers produced by lactic acid bacteria: Characterization and food application. *Polymers*, 15(6), 1539. <https://doi.org/10.3390/polym15061539>

- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., & Cabezas, L. (2010). Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food Microbiology*, 27(1), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.08.006>
- NOM-183-SCFI. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-183-SCFI-2012, Producto lácteo y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4693/seeco1/seeco1.htm>
- Nutryplus. (2018). *Lactiplus* (Conservador)—Nutryplus. <https://nutryplus.com/productos/alimenticia/conservadores/lactiplus/>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Osaili, T. M., Shaker, R. R., Al-Haddaq, M. S., Al-Nabulsi, A. A., & Holley, R. A. (2009). Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 928–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04271.x>
- Padilla-Frausto, J. J. (2010). Diversidad genética y capacidad para formar biopelículas de cepas de *Leuconostoc* spp. Aisladas de una planta procesadora de salchichas. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/818>
- Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>

- Perricone, M., Gallo, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Yeasts. En A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 121–131). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00008-X>
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial spoilage of foods. En *The Microbiological Quality of Food* (pp. 1–21). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9>
- Pogačić, T., Chuat, V., Madec, M.-N., Samaržija, D., Lortal, S., & Valence, F. (2014). Phenotypic traits of genetically closely related *Leuconostoc* spp. *International Dairy Journal*, 39(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.014>
- Pornpukdeewattana, S., Jindaprasert, A., & Massa, S. (2020). *Alicyclobacillus* spoilage and control—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 108–122. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1516190>
- Quintieri, L., Caputo, L., Brasca, M., & Fanelli, F. (2021). Recent advances in the mechanisms and regulation of QS in dairy spoilage by *Pseudomonas* spp. *Foods*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods10123088>
- Ramos Girona, A. J., Marín Sillué, S., Molino Gahete, F., Vila Donat, P., & Sanchis Almenar, V. (2020). Las micotoxinas: El enemigo silencioso. *Arbor*, 196(795), 540. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1004>
- Ranaei, V., Pilevar, Z., Khaneghah, A. M., & Hosseini, H. (2020). Propionic acid: Method of production, current state and perspectives. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 115–127. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6356>
- Rauh, V., & Xiao, Y. (2022). The shelf life of heat-treated dairy products. *International Dairy Journal*, 125, 105235. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105235>

- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.-F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45(Pt A), 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>
- Riesute, R., Salomskiene, J., Moreno, D. S., & Gustiene, S. (2021). Effect of yeasts on food quality and safety and possibilities of their inhibition. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.11.022>
- Sahu, M., & Bala, S. (2017). Food processing, food spoilage and their prevention: An overview. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 3(1). <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.1.1>
- Samson, R. A., Houbraeken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2019). *Food and indoor fungi*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <http://www.westerdijkinstitute.nl/BioloMICSNews.aspx?Rec=18970>
- Schillinger, U., Boehringer, B., Wallbaum, S., Caroline, L., Gonfa, A., Huch (née Kostinek), M., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2008). A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 286(2), 222–226. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01286.x>
- Sharif, Z., Mustapha, F., Jai, J., Mohd Yusof, N., & Zaki, N. (2017). Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 19, 145. <https://doi.org/10.3329/cerb.v19i0.33809>
- SIAP. (2021). *Panorama Agroalimentario 2021* (p. 214). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021)

- SIAP. (2023). *Panorama Agroalimentario 2023*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://online.pubhtml5.com/vqdk/tdyw/>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Silva, M. M., & Lidon, F. (2016). Food preservatives-An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 366–373. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>
- Spreer, E., & Mixa, A. (2017). Milk as a raw material and food. En *Milk and Dairy Product Technology*. Routledge.
- Suh, J. H. (2022). Critical review: Metabolomics in dairy science – Evaluation of milk and milk product quality. *Food Research International*, 154, 110984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.110984>
- Szendy, M., Kalkhof, S., Bittrich, S., Kaiser, F., Leberecht, C., Labudde, D., & Noll, M. (2019). Structural change in GadD2 of *Listeria monocytogenes* field isolates supports nisin resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 305, 108240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108240>
- Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, M.-B., Grosset, N., Galet, O., Breton, V., Gautier, M., & Baron, F. (2020). Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. *Food Microbiology*, 86, 103317. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103317>
- Vélez-Ruiz, J. F. (2018). Capítulo 1: Leche concentrada, evaporada y/o condensada. En *Editorial Universidad Santiago de Cali*. <https://libros.usc.edu.co/index.php/usc/catalog/view/74/79/1256>

- Vihavainen, E. J., Murros, A. E., & Björkroth, K. J. (2008). *Leuconostoc* spoilage of vacuum-packaged vegetable sausages. *Journal of Food Protection*, 71(11), 2312–2315. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.11.2312>
- Visvalingam, J., & Holley, R. A. (2018). Evaluation of chlorine dioxide, acidified sodium chlorite and peroxyacetic acid for control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef patties from treated beef trim. *Food Research International*, 103, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.051>
- Wang, Y., Dai, A., Huang, S., Kuo, S., Shu, M., Tapia, C. p., Yu, J., Two, A., Zhang, H., Gallo, R. I., & Huang, C.-M. (2014). Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Beneficial Microbes*, 5(2), 161–168. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0031>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., Bai, C., Chen, L., Liang, Y., Su, J., Wang, K., Liu, J., & Kjellerup, B. V. (2020). Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 955–961. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08069>
- Yan, P., Daliri, E. B.-M., & Oh, D.-H. (2021). New clinical applications of electrolyzed water: A review. *Microorganisms*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010136>
- Yang, R., Xie, Y., Lombardo, S. P., & Tang, J. (2021). Oil protects bacteria from humid heat in thermal processing. *Food Control*, 123, 107690. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107690>

Zacarías-Muñoz, Y. D. (2011). Efecto de un tratamiento térmico post-empaque sobre la vida de anaquel y las características reológicas y sensoriales de salchichas empacadas al vacío. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1226>

Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp\_1), S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>